

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR DERMATOLOGIE
PROF. DR. MARK BERNEBURG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Inaktivierung von Bakterien auf einer photodynamisch aktiven Oberfläche
mittels unterschiedlicher Photosensibilisatoren

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lisa Rahel de Jonge

2013

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR DERMATOLOGIE
PROF. DR. MARK BERNEBURG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Inaktivierung von Bakterien auf einer photodynamisch aktiven Oberfläche
mittels unterschiedlicher Photosensibilisatoren

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lisa Rahel de Jonge

2013

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

PD Dr. Tim Maisch

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Uwe Ritter

Tag der mündlichen Prüfung:

05.12.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung	1
1.1 Resistenzentwicklung.....	1
1.2 Multiresistente Erreger am Beispiel MRSA	4
1.3 Nosokomiale Infektionen	11
1.4 Photodynamische Inaktivierung von Bakterien.....	12
2 Fragestellung	17
3 Materialien.....	18
3.1 Bakterienstamm	18
3.2 Bakterienkulturmedien.....	18
3.2.1 Müller-Hinton-Bouillon	18
3.2.2 Müller-Hinton-Agar.....	18
3.3 Photosensibilisatoren	18
3.3.1 Porphyrine	18
3.3.2 Phenothiazine	20
3.3.3 Perinaphthenonchlorid.....	23
3.4 Chemikalien und Lösungsmittel	24
3.4.1 Cellulose-Acetat-Pulver	24
3.4.2 Aceton	24
3.4.3 Benzol.....	24
3.4.4 Dimethylsulfoxid.....	24
3.5 Technische Geräte und Hilfsmittel	25
3.5.1 Lichtquellen	25
3.5.2 Laser und Detektionssystem	26
3.5.3 Zentrifugen	26
3.5.4 Spektralphotometer	26

3.5.5	Küvetten	27
3.5.6	Waage	27
3.5.7	Tischschüttelgerät.....	27
3.5.8	Sterilbank.....	27
3.5.9	Thermometer	27
4	Methoden	28
4.1	Bakterienkulturverfahren	28
4.2	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten/KBE als Standardmethode	28
4.3	Die Miles, Misra & Irwin-Methode.....	28
4.4	Phototoxizitätstests mit TMPyP und <i>S. aureus</i> in Suspension	29
4.5	Herstellung der Cellulose-Acetat-Oberflächen	30
4.5.1	Herstellung der CA-Oberfläche.....	30
4.5.2	Einarbeitung der Photosensibilisatoren in die CA-Oberfläche	31
4.6	Spektroskopische Untersuchungen der Cellulose-Acetat-Oberflächen ..	32
4.6.1	Spektroskopische Untersuchungen der CA-Oberflächen mit PS.....	32
4.6.2	Messungen des Farbstoffaustritts aus der CA-Oberfläche	32
4.6.3	Langzeitbestrahlung der CA-Oberfläche ohne und mit TPP	32
4.7	Singulett-Sauerstoff-Messung an CA-Oberflächen mit PS.....	34
4.8	Biologische Versuche mit den CA-Oberflächen und <i>S. aureus</i>	37
4.8.1	Bestimmung der Wiederfindungsrate der Bakterien	37
4.8.2	Phototoxizitätsversuche mit den CA-Oberflächen.....	37
4.9	Datenanalyse	42
5	Ergebnisse	43
5.1	Phototoxizitätstests mit TMPyP und <i>S. aureus</i> in Suspension	43
5.2	Herstellung der CA-Oberflächen mit PS.....	47
5.3	Spektroskopische Untersuchungen der Cellulose-Acetat-Oberflächen ..	49
5.3.1	Spektroskopische Untersuchungen der CA-Oberflächen mit PS.....	49
5.3.2	Farbstoffaustritt aus den CA-Oberflächen	51
5.3.3	Langzeitbestrahlung der CA-Oberflächen ohne PS und mit TPP	59

5.4	Ergebnisse der Singulett-Sauerstoff-Messungen der CA-Oberflächen ..	61
5.5	Ergebnisse der biologischen Versuche mit den CA-Oberflächen	64
5.5.1	Bestimmung der Wiederfindungsrate von <i>S. aureus</i>	64
5.5.2	Phototoxizitätsversuche mit den CA-Oberflächen und <i>S. aureus</i>	65
6	Diskussion.....	76
6.1	Phototoxizitätstests mit TMPyP gegen <i>S. aureus</i> in Suspension	77
6.2	Spektroskopische Untersuchungen der CA-Oberflächen	78
6.3	Singulett-Sauerstoff-Generierung der PS in den CA-Oberflächen	81
6.4	Versuche zur PIB auf den CA-Oberflächen.....	82
6.5	Oberflächendesinfektion durch antimikrobielle Materialien	87
6.6	Resistenzentwicklung gegen die PIB	91
7	Ausblick.....	93
8	Zusammenfassung.....	95
	Abkürzungsverzeichnis	III
	Literaturverzeichnis	VI
	Danksagung	XX

1 Einleitung

1.1 Resistenzentwicklung

Seit der Entdeckung des Antibiotikums Penicillin und anderer antimikrobieller Substanzen im letzten Jahrhundert konnten die meisten bakteriellen Infektionskrankheiten, die die Menschen in der Vergangenheit gefährdet hatten, in der westlichen Welt beherrscht werden [1]. Die rasche Replikations- und Mutationsfähigkeit der Bakterien bis hin zur Resistenzentwicklung gegen Antibiotika stellt die Gesellschaft mittlerweile vor eine Herausforderung [2]. Bakterien sind durch genetische Flexibilität fähig unter dem Selektionsdruck ausgeübt durch Antibiotika zu überleben, sich zu vermehren und in einer Bakterienpopulation dominant zu werden [3]. Bakterien können bis zu 25% ihres Genoms mobilisieren und austauschen. Die Übertragung von Resistenzgenen kann dementsprechend schnell von einem Bakterienstamm auf den nächsten erfolgen und es können multiresistente Erreger (MRE) entstehen [2-5]. Diese überlebenden Erreger können anderen Bakterienarten über verschiedene Mechanismen ihre Resistenzgene übertragen [6], zum Beispiel über Transformation, das heißt durch die aktive Aufnahme freier Bakterien-DNA über Transduktion, durch die Übertragung der DNA über Bakteriophagen als Vektoren oder über Konjugation, durch den Austausch der DNA via Zell-Zell-Kontakt über Plasmide und Transposons [7]. Plasmide als Übertragungsvektoren ermöglichen eine rasche Verbreitung von Resistenzen, da zum Teil multiple Resistenzgene in R-Plasmiden oder mobilen Transposons enthalten sein können. Diese können zudem Informationen gegen mehrere Angriffspunkte der Antibiotika gleichzeitig kodieren. Die Mechanismen, die zu einer Antibiotikaresistenz führen, sind eine Veränderung der Zielstrukturen des antibakteriellen Wirkstoffes im Bakterium, enzymatische Antibiotikamodifikation oder Effluxpumpen [2-4]. Bakterien selbst können modifizierende Enzyme bilden, die einen spezifischen Abbau des Antibiotikums induzieren wie die Spaltung von Penicillin durch die Beta-Laktamase [2]. Beim Efflux bewirken energieabhängige Pumpen den Transport des Antibiotikums aus dem Mikroorganismus. Dadurch kann intrazellulär keine letale Antibiotikakonzentration erzielt werden [8].

Seit 1960 wurden vier Antibiotikaklassen entwickelt, die bakterielle Infektionen bisher ausreichend therapierten und den gesamten globalen Markt beherrschten. Dazu gehören Penicillin und seine Abkömmlinge, wie Cephalosporine, Quinolone, Makrolide und Tetracycline [9]. Die meisten chemischen Grundstrukturen, von denen sich die antimikrobiellen Substanzen ableiten, wurden zwischen 1930 und 1960 eingeführt. Neue antibiotische Medikamente sind durch entsprechende Modifikationen von chemischen Gruppen am Grundgerüst dieser Vorstufen entwickelt worden. Diese Taktik war bislang zielführend, jedoch nur für kurze Zeit therapeutisch effizient und nicht nachhaltig genug, um die Resistenzsituation dauerhaft zu verbessern. Der Entwicklungsfortschritt für komplett neue Antibiotikaklassen verlief bisher langsam [10] (**Abb. 1**). Antibiotika werden allgemein für kurze Therapiezeiträume verschrieben und neuentwickelte meist nur als Reservemittel eingesetzt. Dadurch ist der Absatzmarkt für Pharmafirmen zu klein, als dass sich die Entwicklung einer neuen Grundstruktur lohnen würde [11].

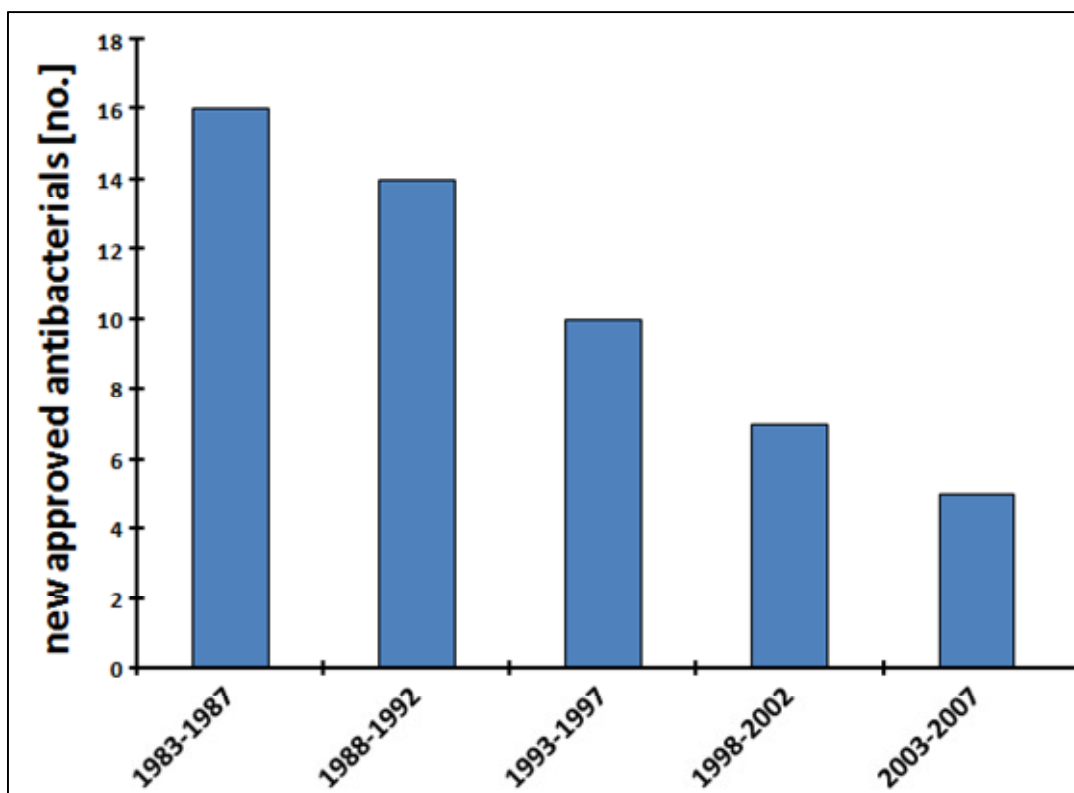


Abb. 1: Darstellung der Entwicklungen neuer antibakterieller Medikamente in dem Zeitraum von 1983-2007 [modifiziert nach [12].

Die Entstehung von Resistenzen gegen antimikrobielle Substanzen ist ein physiologischer Prozess. Im Boden ubiquitäre Bakterien besitzen Gene für Resistenzen. Neue Resistenzen werden immer entstehen und weitergegeben werden [1]. Durch fehlerhafte Anwendung der Antibiotika verlaufen die Resistenzentwicklung und die Ausbreitung resistenter Erreger schneller [13]. Problematisch dabei sind Verschreibungen von Antibiotika bei viralen Infekten, ungenügende Compliance der Patienten, Beimischung der Antibiotika in Futtermitteln, Einsatz in der Landwirtschaft, in der Tiermedizin und in der Wasserwiederaufbereitung. Weitere Ursachen für die Entstehung von Resistenzen können unnötige Antibiotikaphylaxe, Fehler in der Wahl des Antibiotikums, Dosierung und Länge der antibiotischen Therapie und eine falsche oder fehlende Kombinationstherapie sein [2, 3]. In Haushalten steigt die Verwendung antimikrobieller Substanzen, wodurch sich ebenfalls resistente Stämme selektionieren können [3]. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Mikroorganismen wie *Listeria monocytogenes* durch Effluxpumpen Resistenzen gegen Desinfektionsmittel und dadurch Kreuzresistenzen mit Antibiotika entwickeln konnten [14]. Das Ausmaß der Ausbreitung resistenter Mikroorganismen wird durch den mobilen Übertragungsvektor Mensch zudem zu einem globalen Problem. Durch die Verwendung neuer gut wirksamer Reserveantibiotika und Breitspektrumantibiotika ohne Überprüfung einer testgerechten Therapie durch Antibiogramme steigt die Gefahr, dass gegen diese Medikamente Resistenzmechanismen entstehen [3] und das Zeitalter der Antibiotika bald zu Ende sein könnte [3, 15].

1.2 Multiresistente Erreger am Beispiel MRSA

Bekannte multiresistente Erreger (MRE) sind unter anderem Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*- (MRSA-) Stämme, Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) und Breitspektrum-Beta-Laktamase produzierende (extended-spectrum beta-laktamase, ESBL) Enterobakterien, *E. coli*-, und *Klebsiella pneumoniae*- Stämme. Diese führen bei Epidemien auf Stationen in Krankenhäusern zu einem erheblichen Arbeits- und Zeitaufwand für das Klinikpersonal, um eine suffiziente Isolierung und eine adäquate Therapie der Patienten zu gewährleisten [3, 13, 16]. Weitere MRE gibt es bereits bei *Pseudomonas aeruginosa*-, *Acinetobacter spp.*- und *Clostridium difficile*- Stämmen [17]. Von multiresistenten *P. aeruginosa* oder *Acinetobacter spp.* verursachte Infektionen sind vor allem auf Intensivstationen ein Problem und infizierte Patienten sind schwierig zu behandeln [18]. Durch die Verzögerung einer adäquaten Antibiotikatherapie verdoppelt sich bei Patienten auf Intensivstationen mit einer *Pseudomonas*-Bakteriämie die Mortalität im Vergleich zu adäquat behandelten Patienten [19, 20]. Die Verbreitung von Resistenzen bei Gram(-) Enterobakterien ist ebenfalls besorgniserregend, da bei diesen Pathogenen noch weniger Therapieoptionen bei Mehrfachresistenzen existieren [13]. VRE können auf Intensivstationen lang andauernde und schwer einzudämmende Epidemien auslösen und stellen in Transplantationszentren in den USA mittlerweile die häufigsten Nosokomialerreger dar [21, 22].

Ende der 1950er Jahre waren bereits 50% aller *S. aureus*-Stämme gegenüber Penicillin resistent [23]. MRSA stellt seit den 1980er-Jahren ein immer größer werdendes Problem dar [21, 24], was durch steigende MRSA-Raten von *S. aureus*-Isolaten in Deutschland von 1980 mit 1,2% bis 2007 mit 20,3% deutlich wird (**Abb. 2**) [25].

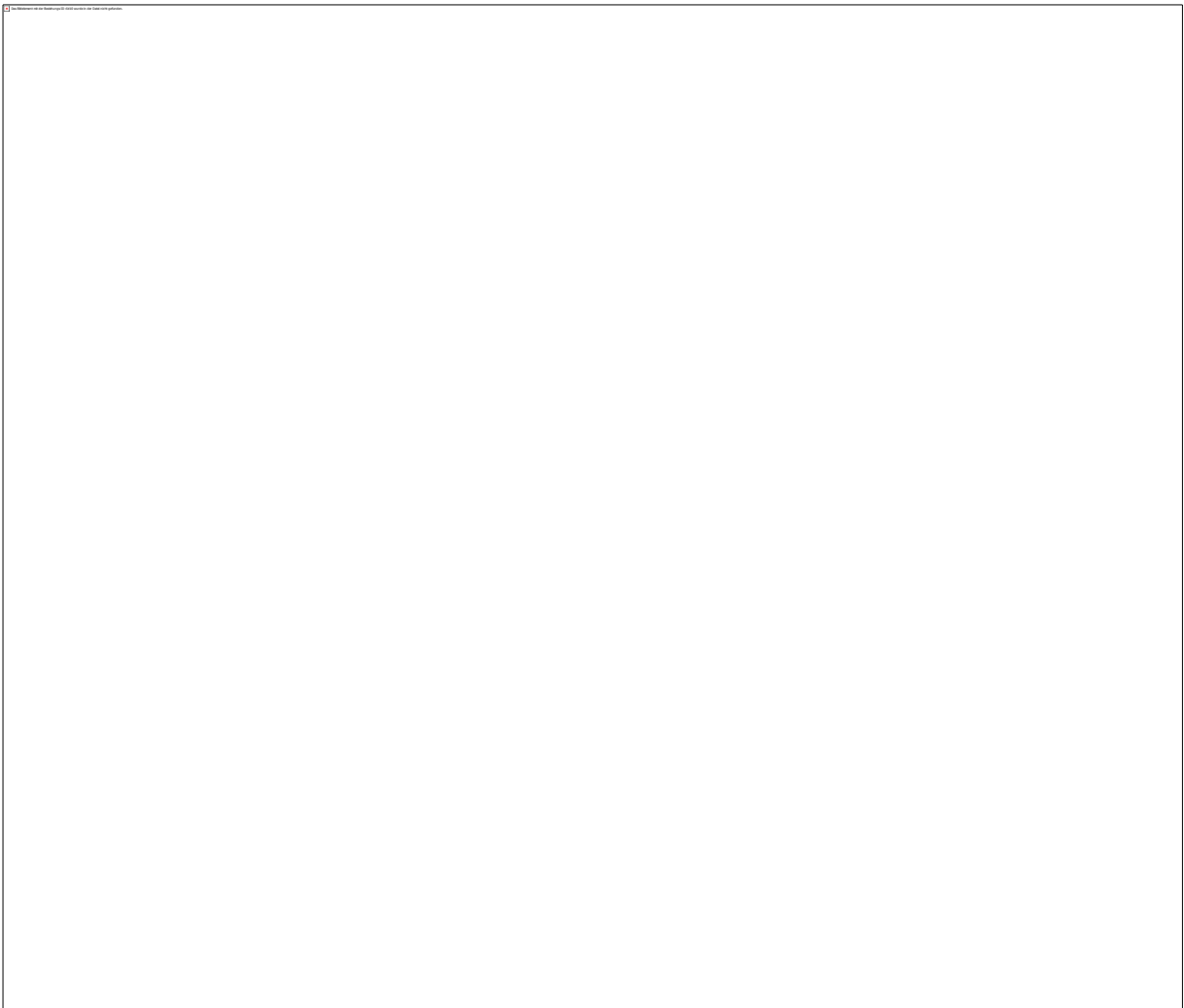


Abb. 2: Darstellung der Resistenzverteilung von MRSA in Europa nach EARSS und ECDC, Bericht 2010 [26].

Nosokomiale MRSA-Infektionen zählen zu den häufigsten Komplikationen eines Krankenhausaufenthalts in Deutschland [21, 27, 28]. Die Inzidenz von MRSA-Fällen in deutschen Krankenhäusern zeigt jedoch von 2006 (0,83) bis 2011 (0,89) eine gleichbleibende Tendenz [29]. MRSA wird meist über Kontakte im Gesundheitswesen übertragen [30, 31]. In Deutschland werden nach der europäischen EARSS-Studie 10-25% aller Infektionen mit *S. aureus* durch MRSA verursacht [32]. In den USA sind es über 50% und in Japan ca. 70% aller *S. aureus*-Infektionen. Die meisten der Patienten, die eine MRSA-Infektion erleiden, sind vor dem Krankenhausaufenthalt bereits mit MRSA besiedelt, was das Problem einer unbemerkten Kolonisation von

Patienten oder dem Krankenhauspersonal verdeutlicht [33, 34]. Eine dauerhafte Besiedlung der Haut mit *S. aureus* weisen ca. 30% aller Menschen auf. Die Prädilektionsstellen für eine Kolonisation sind das Vestibulum nasi als Hauptreservoir. Als weitere Epitope können von dort aus die Hände, die Axilla, die Perinealregion und der Rachen besiedelt werden [33, 35]. Durch eine MRSA-Kolonisierung der Nasenschleimhaut steigt bei Patienten das Risiko eine MRSA-Infektion während eines Krankenhausaufenthalts zu erleiden um bis zu 25% [36]. MRSA ist widerstandsfähig gegen äußere Einflüsse. Der Keim ist weitgehend resistent gegen Austrocknung und besitzt eine hohe pH-Toleranz. An hydrophoben Oberflächen wie Plastikmaterialien und Edelstahllegierungen kann MRSA adhäreren. Dies hat zur Folge, dass es zu Katheter- und Shunt-Infektionen und zu Infektionen bei Gelenkersatz kommen kann [35]. Oberflächen in Krankenhäusern sind Keimreservoir, von denen sich die Pathogene ausbreiten können [37, 38]. Bei Angestellten im Gesundheitswesen sind die Hände durch den Kontakt mit kolonisierten Patienten, kontaminierten Flächen oder Medizinprodukten am häufigsten kolonisiert. Dadurch ergeben sich viele schwierig zu kontrollierende Übertragungswege [39, 40]. Einige dieser Keime, wie Methicillin-sensible *S. aureus* (MSSA) und MRSA, haben Eigenschaften, die sie befähigen, lange Zeit auf diesen Oberflächen zu überleben und ihnen so ein langanhaltendes Infektionspotential verleihen. MRSA kann nach Huang et al. bis zu elf Tage auf Plastiktischen und bis zu neun Tage auf einem Stoffvorhang überleben [41-43]. Eine Infektion oder eine Sepsis mit MRSA führt im Vergleich mit MSSA bedingten Infektionen zu einer signifikant höheren Morbidität und Mortalität. So ist der Risikofaktor an einer MRSA-Sepsis zu versterben im Vergleich zu einer MSSA-Sepsis etwa um das Zweifache erhöht (odds ratio 1,93). Dies ist unter anderem bedingt durch die verzögerte Einleitung einer kurativen Antibiotikatherapie [21, 44, 45].

Die Dekolonisation von MRSA-infizierten Patienten gestaltet sich bisher schwierig und erbringt nicht immer den gewünschten Erfolg. Das Standard-Dekolonisationsregime dauert fünf Tage und besteht aus den Schritten zweimal pro Tag Auftragen einer Mupirocinsalbe auf die kolonisierte Stelle, dreimal pro Tag eine Mundspülung mit einer Chlorhexidinlösung und einer täglichen Ganzkörperwäsche mit 4%igem Chlorhexidin (**Abb. 3**) [46]. Mattner et al. konnten in einer Studie zeigen,

dass die Hälfte des Abstrichmaterials aller mit MRSA besiedelten Patienten nach einiger Zeit (gesamte Halbwertszeit der MRSA-Persistenz: 549 Tage) noch positiv war [47, 48]. Eine spontane Dekolonisation der infizierten Patienten ist in Ausnahmefällen beobachtet worden.

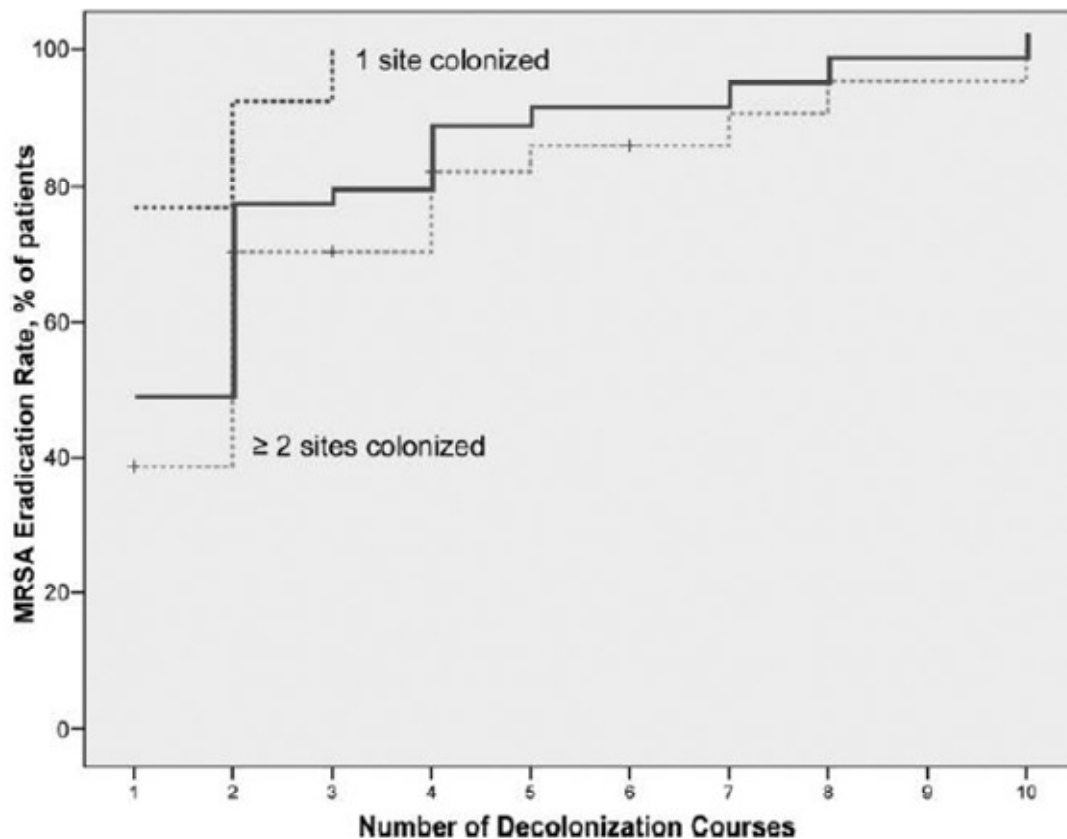


Abb. 3: Darstellung der Anzahl der benötigten Dekolonisationsschritte für eine effektive MRSA-Eradikation; gesamt (durchgängige Linie) und nach der Anzahl an kolonisierten Körperstellen durch MRSA ($P = 0,004$) (gestrichelte Linien) [46]

Ein Reserveantibiotikum gegen MRSA ist Vancomycin. In Japan wurde 1996 über das erste klinische Isolat eines MRSA-Stammes mit reduzierter Empfindlichkeit gegen Vancomycin (*Vancomycin intermediate S. aureus*, VISA) berichtet [49]. Nosokomiale Infektionen (NI) ausgelöst durch VISA traten in den USA und in Frankreich auf [50-52]. In den USA wurden von 2002 bis 2006 insgesamt sieben Fälle einer Infektion mit Vancomycin-resistenten *S. aureus* (VRSA) dokumentiert [53]. Ein wichtiges Reservepräparat gegen MRSA-Infektionen ist Linezolid und eine

Linezolidresistenz bei *S. aureus* ist weltweit noch selten. Die Resistenzwerte von *S. aureus*-Isolaten im Jahr 2011 lagen bei 0,1% [26]. Im Jahr 2007 wurde in Deutschland eine erste sekundäre Linezolidresistenz bei einem Patienten mit einer Beatmungspneumonie nach einer dreiwöchigen Therapie mit Linezolid beschrieben [54]. Ein weiteres multiresistentes *S. aureus*-Isolat wurde 2009 sequenziert, das eine Resistenz gegen Linezolid aufwies und nur auf Glykopeptide, Daptomycin und Tigecyclin empfindlich war [55].

Problematisch ist, dass ein MRSA-Isolat Parallelresistenzen gegen mehrere verschiedene Antibiotikaklassen besitzen kann (**Abb. 4**). Bei diesen MRE ist es entscheidend, eine Weiterverbreitung zu unterbinden [54].

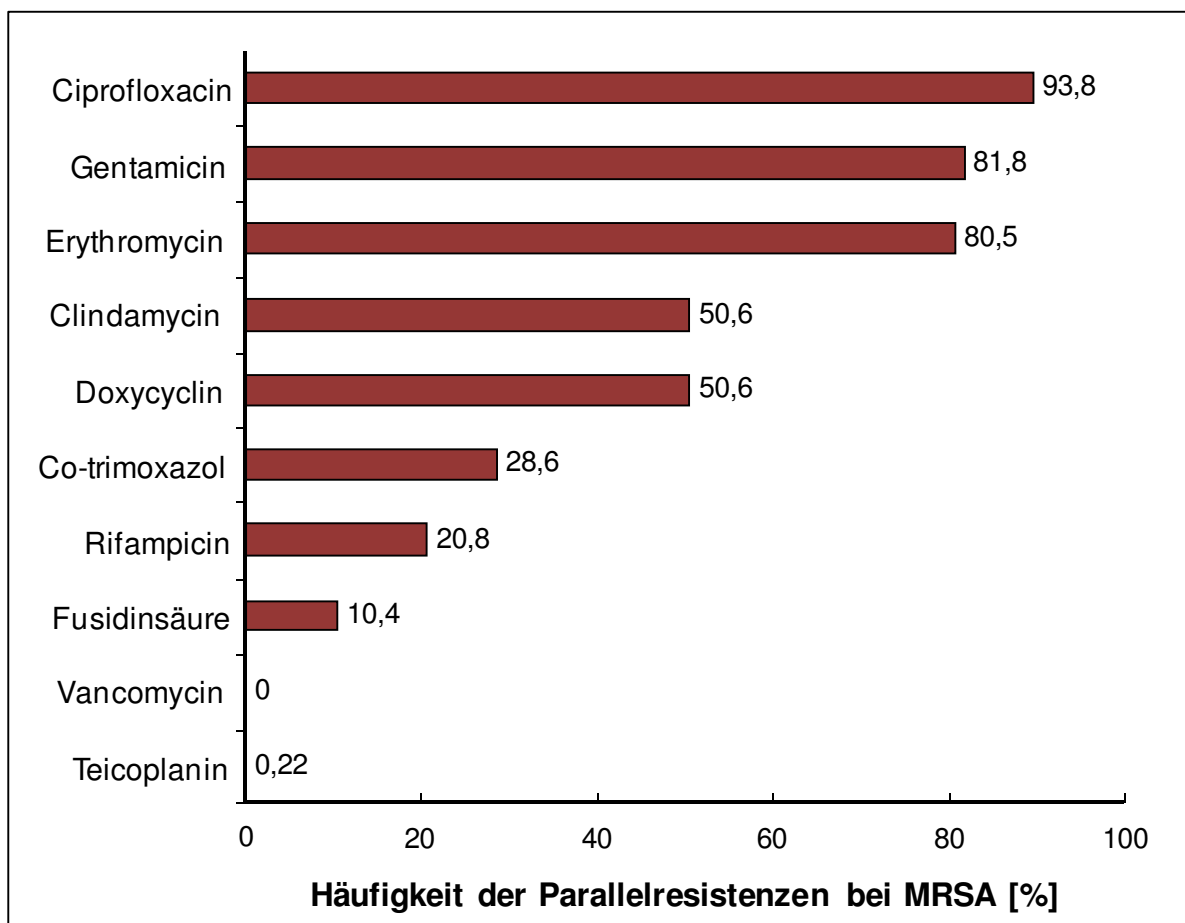


Abb. 4: Darstellung der Häufigkeit der Parallelresistenzen gegen mehrere Antibiotika bei MRSA (2007) [modifiziert nach [25]].

Bei einem Vergleich der MRSA-Last in Europa liegt Deutschland im Mittelfeld, wohingegen skandinavische Länder und die Niederlande stabil niedrige Werte aufweisen können [13, 26] (**Tabelle 1**). Diese sind unter anderem durch ein konsequentes Eingreifen nach dem Prinzip „search and destroy“ in Krankenhäusern bei kolonisierten Patienten zu erklären [21].

Country	Methicillin	
	Number of Isolates tested	% MRSA (95%CI)
Denmark	1362	1,3 (1-2)
Estonia	145	0,7 (0-4)
Finnland	1094	2,3 (1-3)
France	4859	21,6 (20-23)
Germany	1980	20,9 (19-23)
Netherlands	1564	1,2 (1-2)
Norway	1047	0,6 (0-1)
Sweden	2856	0,5 (0-1)
United Kingdom	2684	21,6 (20-30)

Tabelle 1: Anzahl und Anteil der invasiven *S. aureus*-Isolaten, die gegenüber Methicillin (MRSA) resistent sind, einschließlich der Konfidenzintervalle (95% CI), Länderauswahl Europa 2010 [modifiziert nach [26]]

Bei der Ursachenforschung für den MRSA-Anstieg in deutschen Krankenhäusern finden sich eine fehlende Durchführung eines aktiven Screenings kolonisierter Patienten, eine insuffiziente Isolierung dieser und Malcompliance des Klinikpersonals bei der Händedesinfektion [35]. Eine bedeutende Tatsache ist, dass eine effiziente Eindämmung der MRSA-Verbreitung und -Infektionen auf Intensivstationen nicht allein durch Händedesinfektion zu erreichen ist (**Abb. 5**) [21], [56].

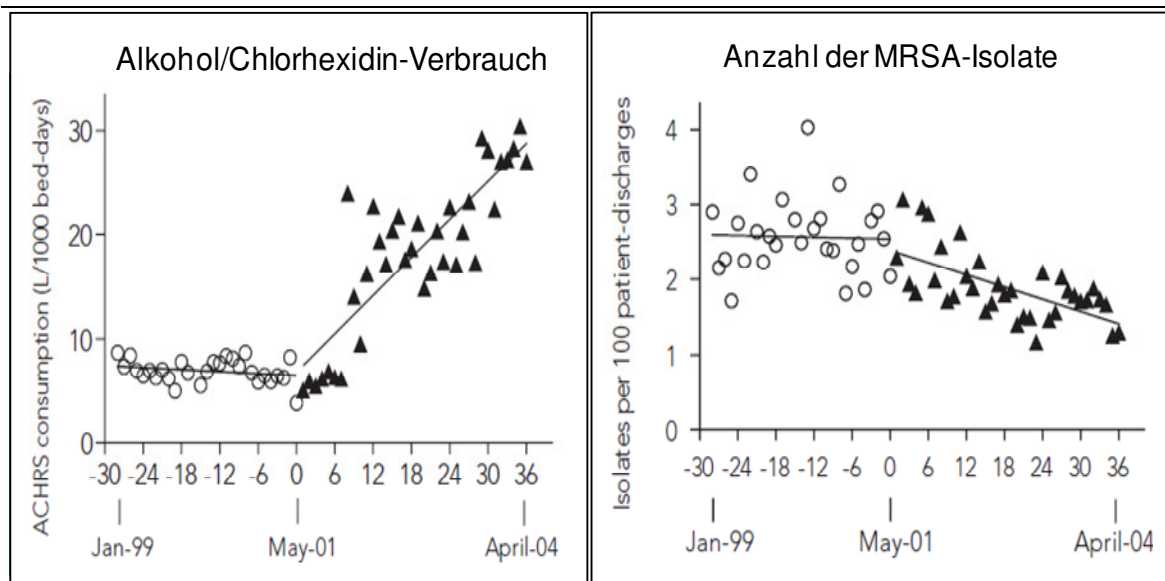
**A****B**

Abb. 5: Darstellung des Zusammenhangs zwischen Desinfektionsmittelverbrauch (Alkohol/Chlorhexidin) (**A**) und Entwicklung der MRSA-Kolonisierung bei Patienten (**B**) vor (○) und nach (▲) einer Hygieneschulung des Personals über Händedesinfektion. Für jeden Zeitraum sind Kurven eingezeichnet [modifiziert nach [57]]

Der Effekt einer Erhöhung des Desinfektionsmittelverbrauchs (alcohol/chlorhexidine hand hygiene solution, ACHRS) zur Händehygiene (**Abb. 5 A**) auf die mit MRSA-kolonisierten Patienten bei Entlassung (**Abb. 5 B**) vor und nach einer Schulung des Klinikpersonals ist in **Abb. 5** dargestellt. Trotz eines deutlichen Anstiegs des Alkohol/Chlorhexidin-Verbrauchs von 16,5 auf 91,8 l/1000-Patienten-Bettentage konnte keine effiziente Minderung des Auftretens von MRSA-Isolaten in der Klinik festgestellt werden und die Rate an MRSA-Isolaten pro 100 entlassene Patienten bewegte sich zwischen 28% und 58% [57].

1.3 Nosokomiale Infektionen

Nosokomiale Infektionen (NI) stellen weltweit ein Problem für Krankenhäuser dar und sie behindern den Erfolg medizinischer Maßnahmen [58]. In den meisten Fällen wird eine NI durch eine endogene Infektion durch die körpereigene Bakterienflora verursacht. Körperfremde Erreger erzeugen in 15-30% der Fälle eine exogene NI. Der Hauptübertragungsweg dabei ist der direkte Kontakt der Patienten mit Händen des Personals oder verunreinigten Gegenständen in Kliniken [21].

Um krankenhausweit gleiche Surveillance-Methoden zur Überwachung der NI zu schaffen, wurde 1996 durch das Nationale Referenzzentrum (NRZ) das Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) ins Leben gerufen [59]. Bei insgesamt 17,5 Millionen stationären Krankenhausaufenthalten im Jahr 2008 in Deutschland wurden basierend auf Hochrechnungen des KISS ca. 28000 primäre (nosokomiale) Septikämien, ca. 126000 katheterassoziierte Harnwegsinfekte, ca. 225000 postoperative Wundinfektionen und ca. 80000 Infektionen der unteren Atemwege verzeichnet [17]. KISS konnte zeigen, dass Intensivstationen mit ca. 57900 NI die höchsten Zahlen vorweisen.

Der häufigste Erreger dabei ist MRSA. Die Anzahl an Infektionen durch andere MRE, wie VRE und ESBL-Keime, steigt jedoch [60]. Die erhöhten Werte auf Intensivstationen können unter anderem durch die Multimorbidität der Intensivpatienten erklärt werden. Das Infektionsrisiko der Intensivpatienten ist fünf- bis zehnfach höher als das der Patienten auf Normalstationen. Dabei sind Risikofaktoren wie das Alter der Patienten, eine chronische Erkrankung wie Diabetes mellitus, Dialysepflichtigkeit, eine bestehende Antibiotikatherapie und der Schweregrad der Grunderkrankung Ursachen für eine erhöhte Anfälligkeit der Patienten. Das Risiko sich mit einem nosokomialen Keim zu infizieren ist zudem höher bei Patienten mit gravierenden Hautläsionen durch Brandverletzungen oder bei anderen erlittenen Traumata. Es ist assoziiert mit dem Einbringen von Fremdkörpern, wie einem Tracheostoma, einem zentralen Venenkatheter, Drainagen, einem Harnwegskatheter und chirurgischen Eingriffen. Daneben stehen NI im Zusammenhang mit therapeutischen Maßnahmen wie Immunsuppression oder einer fehlenden oder falschen Antibiotikaphylaxe [22, 61]. Infektionen mit MRE und damit einhergehende NI erhöhen die Morbidität, Mortalität, die Kosten der

Behandlung, die Hospitalisierungsraten und verlängern den Krankenhausaufenthalt von Patienten [3, 62-64], [27, 45]. Die erhöhten Kostenfaktoren entstehen durch zusätzliche diagnostische und therapeutische Maßnahmen [59], wie der Therapie mit teuren Reserveantibiotika und den notwendigen Hygienemaßnahmen [65-68]. Durch postoperative Wundinfektionen allein kommt es in deutschen Krankenhäusern zu ca. 1 Million Aufenthalten zusätzlich pro Jahr [69].

Die effizienteste Methode zur Vermeidung von NI ist die Händedesinfektion [70-72]. Die niedrigen Complianceraten des Klinikpersonals sind trotz der allgemeinen Akzeptanz des Stellenwerts der Händedesinfektion das Hauptproblem [40, 73-75]. In Anbetracht des wachsenden Problems der weltweit steigenden Antibiotikaresistenzen ist die Sicherstellung der Compliance bei Krankenhausmitarbeitern essentiell [58, 76]. Zielführend können bei der Eindämmung der Infektionen die Infektionskontrolle durch die Identifizierung des Problems, das Verstehen der Mechanismen zur Resistenzentwicklung und der Einsatz einer adäquaten Therapie sein [20].

1.4 Photodynamische Inaktivierung von Bakterien

Eine wiederentdeckte, altbekannte Methode Bakterien zu töten, ist die photodynamische Inaktivierung von Bakterien (PIB). Das Prinzip der Phototoxizität wurde erstmals 1900 von Oskar Raab beschrieben. *Paramecium caudatum*, behandelt mit dem Farbstoff Acridinhydrochlorid, starb unter der Einwirkung einer bestimmten Lichtintensität ab [77]. Raabs Doktorvater Hermann von Tappeiner führte 1903 mit einem eosinhaltigen Farbstoff und Licht erste Phototoxizitätsversuche zur Behandlung von Krebs, Tuberkulose und Syphilis auf der Haut des Menschen durch, obwohl der genaue Wirkmechanismus der Therapie noch nicht bekannt war [78]. Erst 1904 gelang von Tappeiner dies, indem er die Toxizität des Prozesses nicht auf die einwirkende Hitzeentwicklung zurückführte, sondern in Zusammenhang mit Sauerstoff brachte und den Begriff der photodynamischen Reaktion prägte [79]. Um das Jahr 1905 wurde erstmals die Toxizität von Eosin in Verbindung mit Licht gegen das pathogene Bakterium *Streptococcus pyogenes* beschrieben [80]. Als Option bei verschiedenen Krankheiten ist dieses Verfahren als photodynamische Therapie (PDT) indiziert [81]. Die PDT findet Verwendung bei Behandlungen von Tumoren der Lunge [82], des Gastrointestinaltraktes, wie Erkrankungen des Ösophagus [83, 84],

von Tumoren der Blase [85], der Prostata [86] und bei der Therapie von malignen Neoplasien der Haut [87], wie Basalzellkarzinomen [88] und Aktinischen Keratosen [89].

Bei der PDT wird die Kombination aus sichtbarem Licht, Sauerstoff und Photosensibilisatoren (PS) genutzt, um eine phototoxische Reaktion auszulösen [90]. Die PS werden durch Licht einer bestimmten Wellenlänge, die ihrem Absorptionsmaximum entspricht, angeregt [91]. Die Energie kann der PS als Wärme oder Fluoreszenz abgeben oder er relaxiert über einen angeregten Triplett (T_1)-Zustand wieder zurück in den Grundzustand. Unter aeroben Bedingungen folgen zwei konkurrierende photooxidative Prozesse, bei denen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen, die die Phototoxizität induzieren [90-94]. Bei der Typ-I-Reaktion wird ein Elektron oder ein Wasserstoffatom auf Sauerstoff übertragen und es entstehen ROS wie Superperoxidanionen, Peroxidradikale oder Hydroxylradikale [91]. Wenn die Energie direkt von dem PS auf molekularen Sauerstoff übertragen wird, spricht man von einer Typ-II-Reaktion. Dabei entsteht der hochreaktive Singulett-Sauerstoff (1O_2) [93-96]. Ob ROS, Singulett-Sauerstoff oder beide Reaktionsprodukte für die PIB verantwortlich sind, ist noch nicht gänzlich geklärt. Aktuell geht man davon aus, dass die Typ-II-Reaktion und die damit einhergehende Singulett-Sauerstoff-Generierung bei der PIB in Suspension die entscheidende Rolle spielt [95]. Ob eine zusätzliche phototoxische Wirkung bei der PIB durch Radikale erzeugt wird, kann nicht ausgeschlossen werden und ist unter anderem abhängig von der chemischen Struktur des PS.

Wegen seiner kurzen Halbwertszeit von 40 ns und der dadurch bedingten Diffusionsreichweite von 200 nm in Suspension kann Singulett-Sauerstoff nur in seiner direkten Nachbarschaft weitere oxidative Reaktionen initiieren [97]. Dort kommt es anschließend zur Photooxidation von Biomolekülen [94, 98-100]. Bei der PIB in Suspension muss der PS nahe an die Zielstrukturen gelangen, entweder in das Bakterium oder an seine Zytoplasmamembran, bevor der entstehende Singulett-Sauerstoff effektiv seine Wirkung entfalten kann [93, 95, 101]. Wirksame PS sind synthetische Nicht-Porphyrinderivate aus der Gruppe der Phenothiazine wie Methylenblau oder Toluidinblau und makrozyklische Moleküle mit einer

Tetrapyrrolringstruktur wie Phthalocyanine oder Porphyrine. Ebenfalls phototoxisch wirksam sind natürlich vorkommende PS, wie Psoralene und Perylenquinoide [95].

Viele PS zeigen bei Gram(+) und Gram(-) Bakterien einen phototoxischen Effekt. Dieser ist bei Gram(-) Bakterien jedoch oft geringer [102-107]. Der Unterschied in der Effektivität liegt an dem unterschiedlichen Aufbau der Bakterienzellwand [6]. Gram(+) Bakterien haben eine dicke äußere Zellwand, die vorwiegend aus Peptidoglykanen aufgebaut ist, in die Teichonsäuren und Proteine eingebettet sind. Gram(-) Bakterien besitzen neben einer dünnen Peptidoglykanschicht eine äußere bilaminäre Lipidmembran als zusätzlichen Permeabilitätsschutz [108]. Dieser wirkt unter anderem gegen die Antibiotikaklasse der Glykopeptide und verhindert die Penetration in die Bakterienzelle. Zwischen den beiden Schichten befindet sich der periplasmatische Raum. Die äußere Lipidmembran enthält an ihrer Außenseite negativ geladene Lipopolysaccharide (LPS) und Porinkanäle. Dementsprechend können neutrale oder negativ geladene PS an der äußeren Membran der Gram(-) Bakterien nicht effektiv andocken oder diese durchdringen [92, 95]. Eine ausreichende Singulett-Sauerstoff-Konzentration zur irreversiblen Schädigung der Bakterien kann nicht erreicht werden [94].

Gegen Gram(-) Bakterien sind vor allem kationische PS wirksam [109-111]. Durch die positive Ladung können diese PS eine ionische Bindung zu den negativ geladenen LPS herstellen. Denkbar ist daneben ein selbstinduzierter Aufnahmeweg der positiv geladenen PS in das Bakterium, in dem diese PS anstelle von Kationen wie Calcium oder Magnesium an die Zellwand andocken. Beide Mechanismen führen zur Desorganisation der Zellwand, wodurch ihre Permeabilität steigt und mehr PS in die Zelle gelangen können [108, 112]. Aufgrund der lipophilen Eigenschaften der PS akkumulieren diese innerhalb oder außerhalb der Bakterienzellmembran. Je höher dort die PS-Konzentration ist, desto wirksamer kann bei der Bestrahlung ein irreversibler Schaden induziert werden [94, 105]. Singulett-Sauerstoff schädigt die Lipide oder Proteine der Zytoplasmamembran. Dabei entstehen Lipidperoxide, die durch Schädigung der Membran die funktionelle Beeinträchtigung der Zelle weiter fortschreiten lassen [95]. Reddi et al. stellten fest, dass die Toxizität von Singulett-Sauerstoff gegen Gram(-) Bakterien durch die Verschlechterung der

Transportfunktion der zytoplasmatischen Membran und durch die Minderung der enzymatischen Funktion bedingt ist [113].

Gram(+) Bakterien werden bei Bestrahlung effektiv von neutralen, anionischen oder kationischen PS eliminiert [111]. Um die Effektivität der PS gegen Gram(-) Bakterien zu steigern und ihre Konzentration an den Angriffszielen zu erhöhen, können die Bakterien mit EDTA oder Polymyxin B [111] vorbehandelt werden. Die Zusätze machen die äußere Bakterienwand durchlässiger [92], indem sie die Ordnung ihrer Bestandteile stören [114]. Für eine erfolgreiche medizinische Anwendung müssen von den PS weitere Eigenschaften erfüllt werden. Die PS sollten eine minimale Dunkeltoxizität haben, rasch aus dem menschlichen Organismus ausgeschieden werden und ihre Absorptionsmaxima sollten in dem Bereich von 600 - 800 nm liegen, da dort die Eindringtiefe in lebendes Gewebe am größten ist [115].

Es wurden viele Ansätze verfolgt, um die Übertragung von Erregern und daraus resultierende Infektionen durch effiziente Händedesinfektion zu unterbinden. Es wurde unter anderem der Einsatz von Hygienefachkräften beschlossen, die die Surveillance in Kliniken durchführen sollten. Die Surveillance beinhaltet die Vermittlung kostensparender Infektionsprävention mit Leistungsfeedback an das Klinikpersonal und Interventionen, beispielsweise Qualitätszirkel auf den Stationen [59]. Durch die WHO wurden Aktionen zur Prävention von NI eingeführt, wie der „internationale Tag der Händehygiene“ unter dem Motto „Save Lives: Clean Your Hands“. In Deutschland wurde im Januar 2008 die „Aktion Saubere Hände“, bei der sich mittlerweile 522 Krankenhäuser beteiligen, gestartet. Zur Verbesserung der Händehygiene wurde ein Zusammenschluss der deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH), des Berufsverbandes der deutschen Chirurgen (BDC) und des Berufsverbandes der deutschen Hygieniker (BDH) unter dem Motto „Patientenschutz durch Hygiene“ gegründet [58]. Zur Überwachung der Compliance der Angestellten im Gesundheitswesen wurde auf Stationen unter anderem der Verbrauch von Händedesinfektionsmitteln gemessen [76].

Ein optimaler Weg zur Infektionsprävention konnte in den Programmen nicht entwickelt werden. Bei Korczak et al. konnte gezeigt werden, dass die Hygieneziele nicht mit den vorhandenen Ressourcen allein erreicht werden können, sondern mehr

Hygienepersonal, Klinikhygieniker und Training des Klinikpersonals benötigt werden, um die Compliance zu verbessern und die Anwendung von Antibiotika zu optimieren [116].

Die PIB ist eine vielversprechende Methode, um die entstehende Lücke zwischen der Entwicklung neuer Antibiotika und Resistenzentstehung zu schließen und kann, angewendet auf inerten Oberflächen, in der Zukunft möglicherweise einen Beitrag zur Verhinderung der Ausbreitung von MRE und zur Verbesserung der Infektionsproblematik in deutschen Krankenhäusern leisten.

2 Fragestellung

Die erfolgreiche Anwendung der photodynamischen Inaktivierung von Bakterien (PIB) in Suspension ist bekannt. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde eine photodynamisch aktive Oberfläche bestehend aus einem Cellulose-Acetat-Aceton-Gemisch und einem PS hergestellt, um eine selbstdesinfizierende Oberfläche zu erhalten. Das Prinzip der PIB wurde auf dieser inerten Kunststoffoberfläche mit eingearbeiteten Photosensibilisatoren (PS) gegenüber Bakterien untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit wurde zur Verdeutlichung des Prinzips der PIB die Wirksamkeit des Referenzfarbstoffs TMPyP, der sich bereits als wirksam gegen Gram(+) Bakterien erwiesen hat, als PS gegen *S. aureus* in Suspension überprüft.

Ziele des zweiten Teils der Arbeit waren die Herstellung der Kunststoffoberfläche aus Cellulose-Acetat (CA-) Pulver und Aceton nach der Forschungsgruppe von Valérie Decraene et al. und die Überprüfung der PIB auf einer inerten photodynamisch aktiven Oberfläche [117, 118]. Bei der Fertigung der CA-Oberflächen wurden anschließend hydrophile und lipophile PS aus der Gruppe der Porphyrine, Phenothiazine und Perinaphthenone eingearbeitet, um diese auf ihre phototoxische Wirkung gegenüber *S. aureus* zu untersuchen.

Zunächst wurden in den CA-Oberflächen die PS spektroskopisch untersucht, wie sich ihre Absorptionsspektren im Vergleich zu den PS in Lösung verhalten und ob sich PS aus den Kunststoffplatten in *Aqua dest.* als Lösungsmittel herauslösen. Anschließend erfolgten Singulett-Sauerstoff-Messungen mit den CA-Oberflächen.

Bei den Phototoxizitätsversuchen mit *S. aureus* wurden die CA-Oberflächen mit PS getestet, mit denen stabile CA-Oberflächen hergestellt werden konnten. Bei den Versuchen wurden die CA-Oberflächen mit den eingearbeiteten PS unter verschiedenen Bedingungen, die Farbstoffkonzentrationen, Bestrahlungsintensitäten und Bestrahlungszeiten betreffend, untersucht, um die effektivste Methode, die zur Inaktivierung der Bakterien führt, zu etablieren.

3 Materialien

3.1 Bakterienstamm

Staphylococcus aureus ATCC 25923 von DSMZ, der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig-Strain DSM. *S. aureus* ist ein Gram(+) Bakterium, ubiquitär vorhanden und ein Leitkeim für NI.

3.2 Bakterienkulturmedien

3.2.1 Müller-Hinton-Bouillon

Von der Firma Oxoid (Wesel, Deutschland), Inhalt: 2,0 gr/l Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300 gr, 17,5 gr/l Caseinhydrolysat, 1,5 gr/l Stärke, pH: $7,4 \pm 0,2$

3.2.2 Müller-Hinton-Agar

Von der Firma Oxoid (Wesel, Deutschland), Inhalt: siehe Müller-Hinton-Bouillon, zusätzlich mit 13 gr/l Agar-Agar versetzt

3.3 Photosensibilisatoren

3.3.1 Porphyrine

3.3.1.1 TMPyP

Der Photosensibilisator TMPyP meso-5, 10, 15, 20-Tetrakis(1-methyl-4-pyridino)-21H, 23H-porphin wurde von Sigma-Aldrich®Chemistry (Taufkirchen, Deutschland) mit einer Reinheit von $\geq 99\%$ bezogen. Dieser PS hat sich in verschiedenen Studien als wirksam erwiesen [119, 120] und wurde in der vorliegenden Arbeit als Referenzfarbstoff eingesetzt. Die Summenformel ist $C_{72}H_{66}N_8O_{12}S_4$ (**Abb. 6 A**). Das Molekulargewicht (MW) beträgt 1363,63 gr/mol und das Absorptionsmaximum, die Soret-Bande, liegt bei 421 nm (**Abb. 7 A**). Der Farbstoff ist löslich in Wasser, Methanol und Ethanol.

3.3.1.2 TPP

TPP (meso-5, 10, 15, 20-Tetraphenylporphyrin) ist ein von Frontier Scientific bezogener Farbstoff aus der Gruppe der Porphyrine mit der Summenformel $C_{44}H_{30}N_4$ (**Abb. 6 B**). Das Absorptionsmaximum, die Soret-Bande, liegt bei einer Absorption von 99,98 % zwischen 416,5 nm und 425 nm (**Abb. 7 B**). Das MW beträgt 614,74 gr/mol. TPP ist ein hydrophober Farbstoff und löslich in Benzol und Toluol.

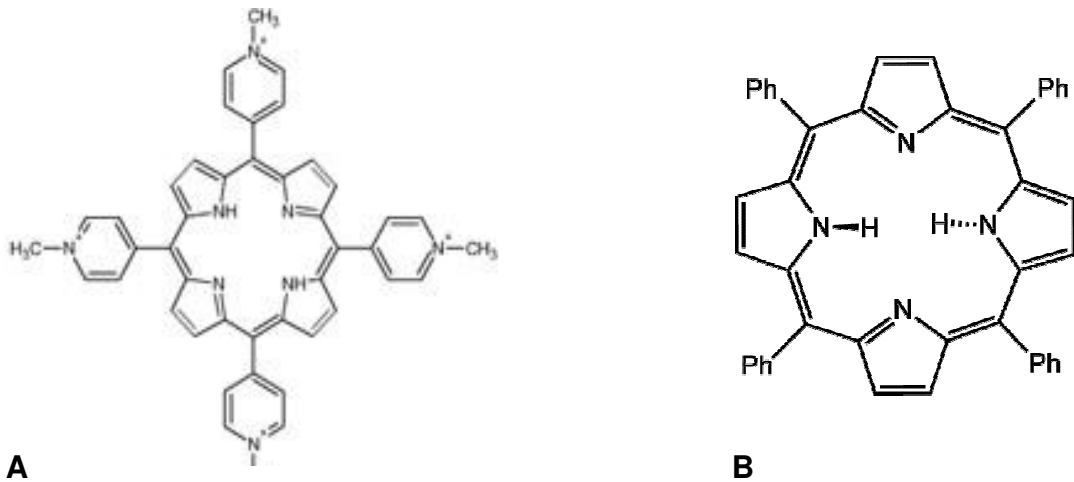


Abb. 6: Darstellung der Strukturformeln von TMPyP (**A**) und TPP (**B**) aus der Gruppe der Porphyrine.

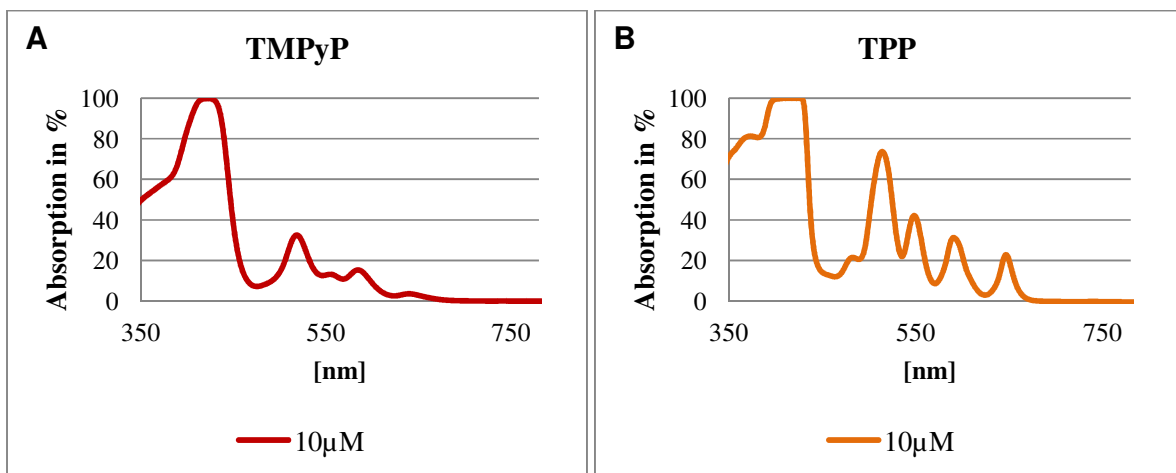


Abb. 7: Exemplarische Darstellung der Absorptionsspektren von TMPyP in *Aqua dest.* (**A**) und TPP in Benzol (**B**) (je 10µM). Das Absorptionsprofil beider PS ist für Porphyrine charakteristisch und besteht aus der Soret-Bande im Bereich zwischen 390 - 425 nm und den bis zu vier Q-Banden im sichtbaren Wellenlängenbereich von 480 - 700 nm.

3.3.2 Phenothiazine

3.3.2.1 Methylenblau

Methylenblau (MB) wurde von der Firma Sigma-Aldrich®Chemistry (Steinheim, Deutschland) mit einer Reinheit von >97% bezogen. MB ist ein hydrophiler Farbstoff mit einem MW von 373,90 gr/mol und einem Absorptionsmaximum bei 663,5 nm (**Abb. 9 A**). Die Summenformel ist $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$ (**Abb. 8 A**).

3.3.2.2 Toluidinblau O

Toluidinblau O (TBO) wurde von der Firma TCI Europe (Zwijndrecht, Belgien) bezogen. Die Strukturformel ist $C_{15}H_{16}ClN_3S$ (**Abb. 8 B**), das MW 305,83 gr/mol und das Absorptionsmaximum liegt bei 625,5 nm (**Abb. 9 B**). Die Löslichkeit von TBO ist gut in Wasser.

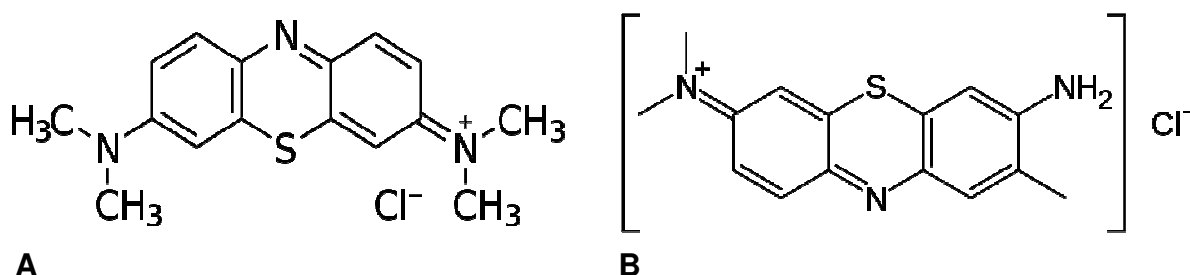


Abb. 8: Darstellung der Strukturformeln von MB (**A**) und TBO (**B**). MB und TBO sind hetero-tri-zyklische Phenothiazine mit positiver Ladung [121, 122].

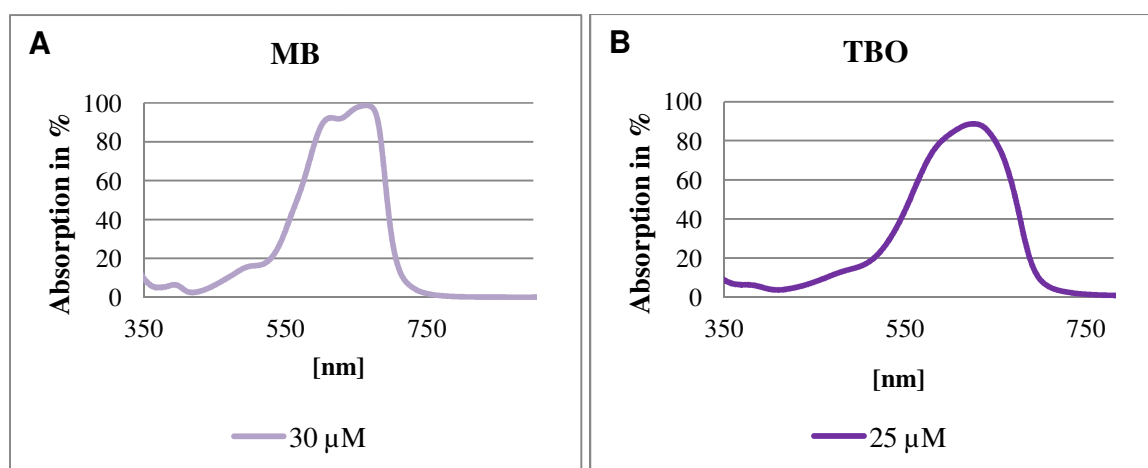


Abb. 9: Exemplarische Darstellung der Absorptionsspektren von MB (**A**) und TBO (**B**) in *Aqua dest.* (30 µM für MB und 25 µM für TBO)

3.3.2.3 MB-S1

Das Phenothiaziniumsalz MB-S1 wurde in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für organische Chemie der Universität Regensburg (Prof. Dr. B. König) von Dr. rer. nat. A. Späth hergestellt. Der lipophile Farbstoff hat die Summenformel $C_{28}H_{30}N_3SI$ (**Abb. 10 A**) und das MW beträgt 559,47 gr/mol. Das Absorptionsmaximum liegt bei 799,5 nm (**Abb. 11 A**). MB-S1 ist löslich in DMSO, DCM, Aceton und Chloroform.

3.3.2.4 MB-S2

Dieses lipophile MB-Derivat wurde in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für organische Chemie der Universität Regensburg (Prof. Dr. B. König) von Dr. rer. nat. A. Späth synthetisiert. Das Phenothiaziniumsalz hat die Summenformel $C_{26}H_{22}N_3SI$ (**Abb. 10 B**) und ein MW von 535,45 gr/mol. Das Absorptionsmaximum liegt bei 656,5 nm (**Abb. 11 B**). MB-S2 ist löslich in DMSO, DCM, Aceton und Chloroform.

3.3.2.5 MB-S3

Das Phenothiaziniumsalz MB-S3 wurde in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für organische Chemie der Universität Regensburg (Prof. Dr. B. König) von Dr. rer. nat. A. Späth hergestellt. Das MW des MB-Derivats mit der Summenformel $C_{38}H_{30}N_3SI$ (**Abb. 10 C**) beträgt 687,65 gr/mol und die Absorptionsmaxima liegen bei 321,5 nm und 616,5 nm (**Abb. 11 C**). MB-S3 ist in DMSO, DCM, Aceton und Chloroform löslich.

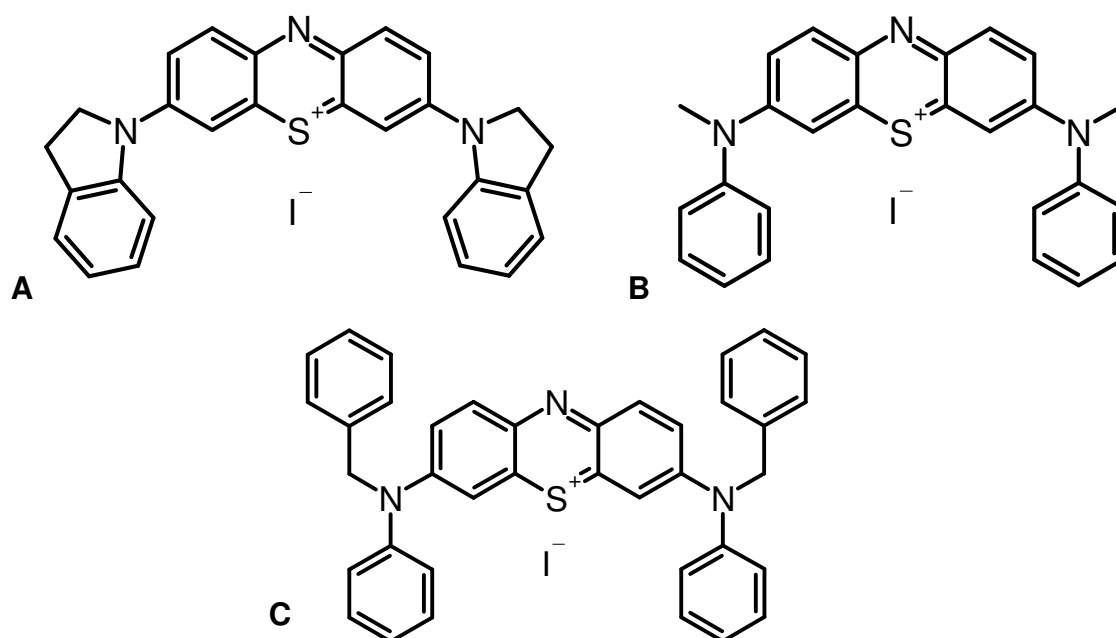


Abb. 10: Darstellung der Strukturformeln von MB-S1 (**A**), MB-S2 (**B**), MB-S3 (**C**)

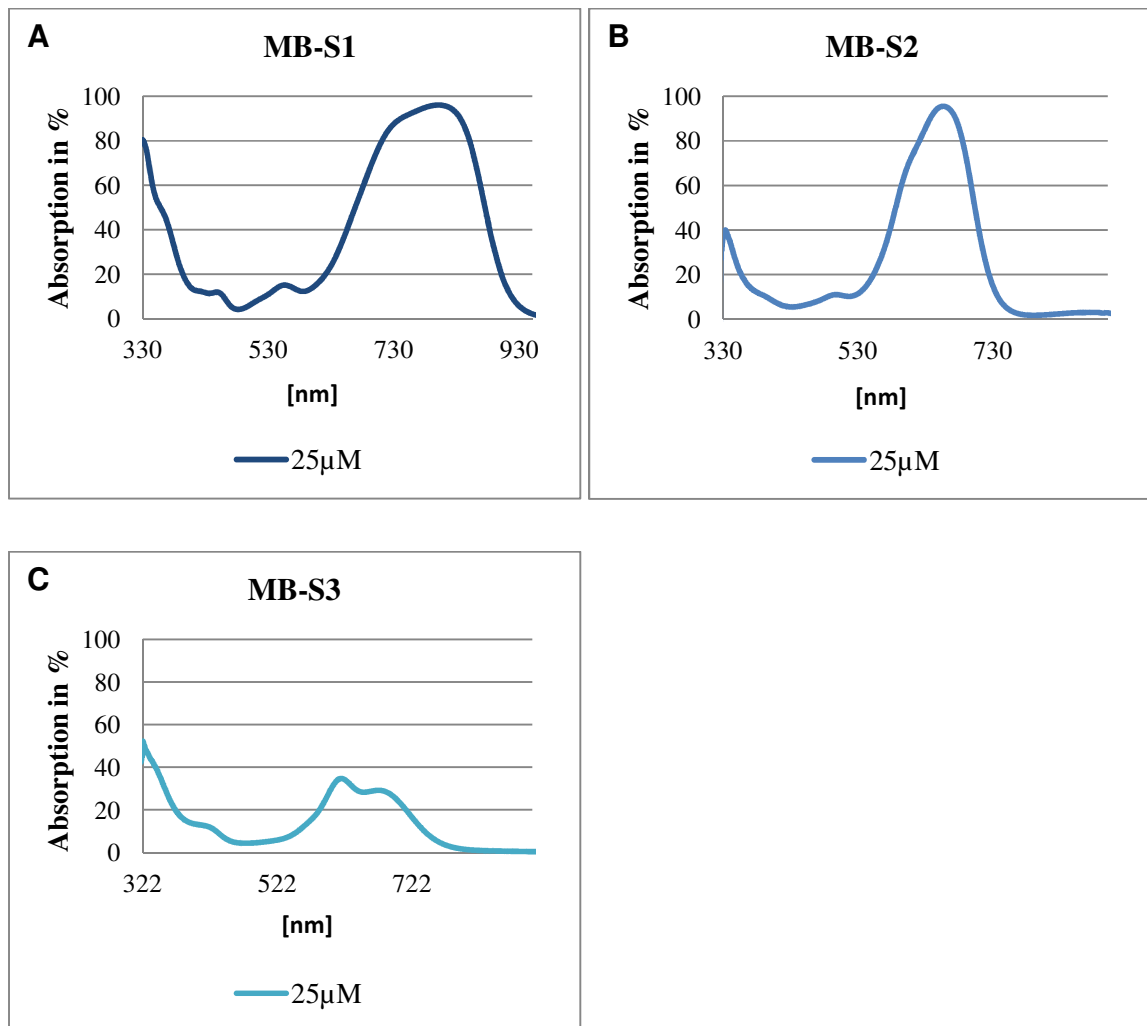


Abb. 11: Exemplarische Darstellung der Absorptionsspektren der Farbstoffe MB-S1 in DMSO (A), MB-S2 in Aceton (B), MB-S3 in DMSO (C) (je 25 µM)

3.3.3 Perinaphthenonchlorid

Perinaphthenonchlorid (PN-Cl) wurde in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für organische Chemie der Universität Regensburg (Prof. Dr. B. König) von Dr. rer. nat. A. Späth synthetisiert. Perinaphthenon, die Ausgangssubstanz des lipophilen PN-Cl_s, ist als Photosensibilisator für eine suffiziente Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} bekannt [123]. Das Absorptionsmaximum von PN-Cl mit der Summenformel $C_{14}H_9OCl$ (**Abb. 12**) und dem MW von 228,67 gr/mol liegt im UV-Bereich bei 387 nm (**Abb. 13**). PN-Cl ist in DMSO, DCM, Aceton, Chloroform und Methanol löslich.

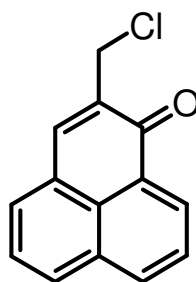


Abb. 12: Darstellung der Strukturformeln von dem aromatischen Keton PN-Cl

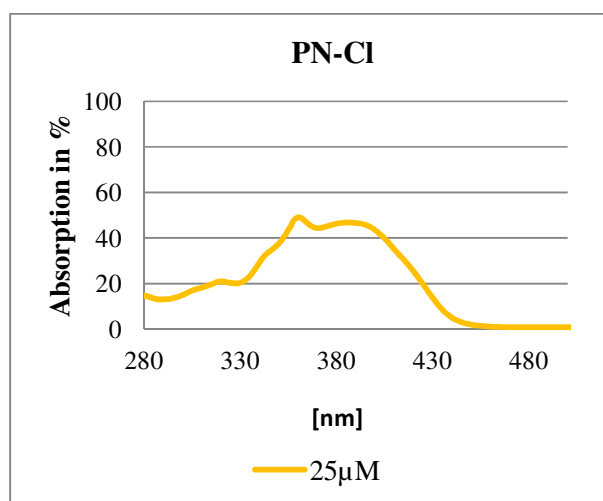


Abb. 13: Exemplarische Darstellung des Absorptionsspektrums von PN-Cl in Benzol (25 μM)

3.4 Chemikalien und Lösungsmittel

3.4.1 Cellulose-Acetat-Pulver

Der thermoplastische Kunststoff Cellulose-Acetat (CA) bezogen von der Firma Sigma-Aldrich®Chemie GmbH (Steinheim, Germany) wird aus Cellulose und Acetylsäure hergestellt und ist in Aceton löslich.

3.4.2 Aceton

Aceton zur Analyse wurde mit der Reinheit $\geq 99,8\%$ von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen (Strukturformel CH_3COCH_3 , MW 58,07 gr/mol, 1l = 0,79 kg).

3.4.3 Benzol

Benzol zur Analyse wurde mit der Reinheit $\geq 99,7\%$ von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen (Strukturformel C_6H_6 , MW 78,11 gr/mol, 1l = 0,88 kg).

3.4.4 Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid (DMSO) getrocknet zur Analyse (max. 0,05 % H_2O) wurde mit der Reinheit $\geq 99,5\%$ von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen (Strukturformel $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$, MW 78,13 gr/mol, 1l = 1,10 kg).

3.5 Technische Geräte und Hilfsmittel

3.5.1 Lichtquellen

3.5.1.1 Lampe UV 236

Lampe UV 236 (λ_{em} 380 - 480 nm) von der Firma Waldmann Medizintechnik (Villingen-Schwenningen, Deutschland), Leistung 15,3 mW/cm², Emissionsmaximum bei 422 nm (**Abb. 14**).

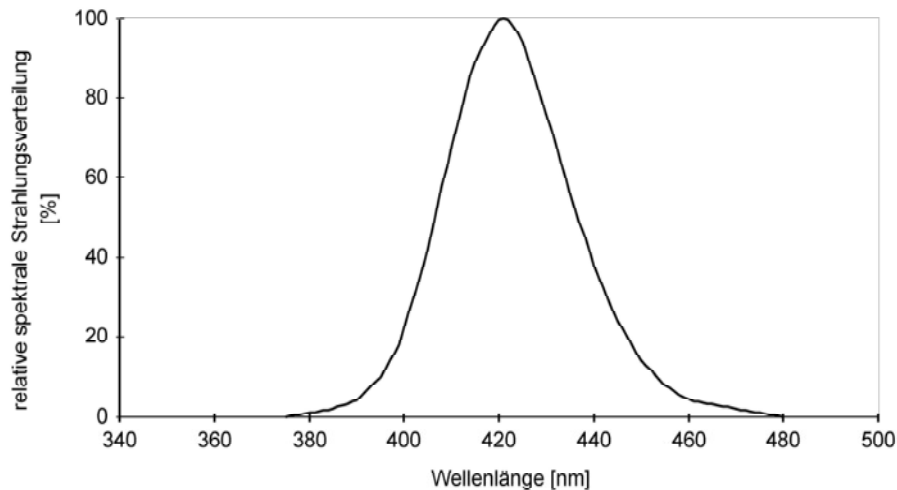


Abb. 14: Emissionsspektrum der Lampe UV 236 (λ_{em} 380 - 480 nm)

3.5.1.2 OmniCure®Series 2000

OmniCure®Series 2000 (λ_{em} 390 - 500 nm) von der Firma Photonic Solutions Inc. (Friedelsheim, Deutschland), Emissionsmaxima bei 405 nm und 436 nm (**Abb. 15**).

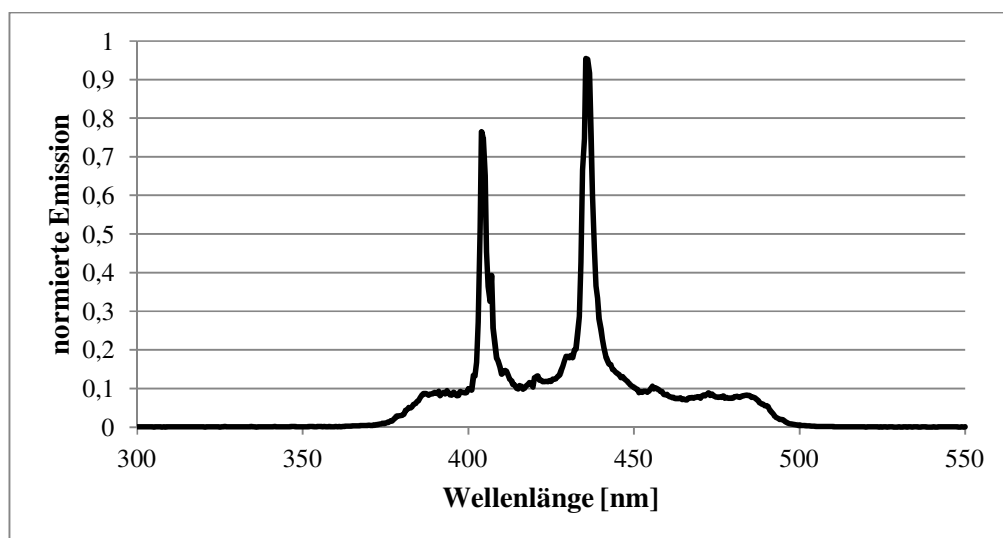


Abb. 15: Emissionsspektrum der Lampe OmniCure®Series 2000 (λ_{em} 390 - 500 nm)

3.5.1.3 Teclas Source

Teclas Source PTL-Penta (λ_{em} 550 – 750 nm) mit dem Filter 2 (Sorengo, Schweiz), Emissionsmaximum bei 650 nm (**Abb. 16**).

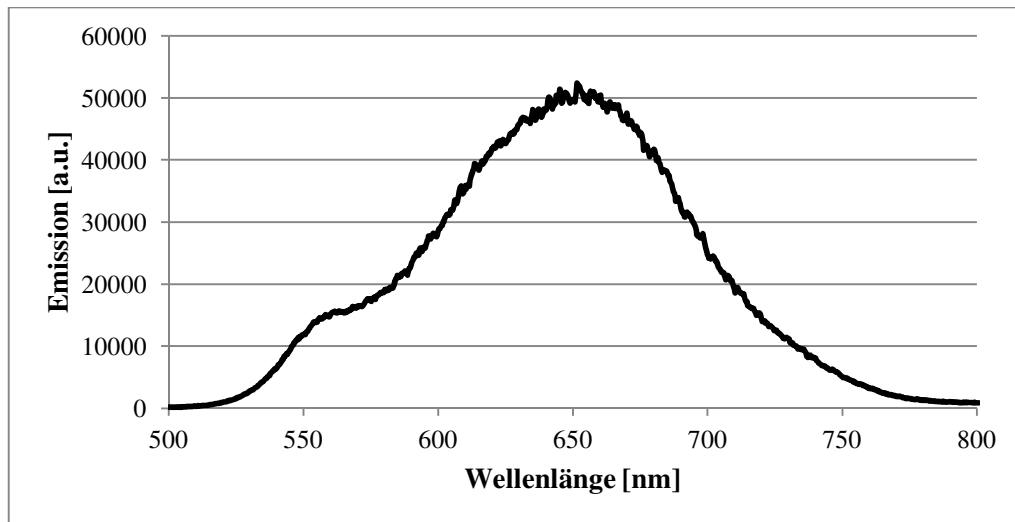


Abb. 16: Emissionsspektrum der Lampe Teclas Source, Filter 2 (λ_{em} 550 – 750 nm)

3.5.2 Laser und Detektionssystem

Nd:YAG-Laser von der Firma Photon Energy AWL GmbH (Ottensos, Deutschland), Pulsdauer 60 ns mit 2 kHz Wiederholungsrate, Emission zweier separater Strahlen der Wellenlängen 355 nm oder 532 nm, variable Leistungskapazität zwischen 0 – 100 mW (verwendet: Wellenlänge 532 nm, Leistung 50 mW)

Photomultiplier (PMT, Infrarotdetektor) R5509-42, gekühlt auf 77 °K mit Stickstoff infrarotsensitiv von der Firma Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH (Herrsching, Deutschland)

3.5.3 Zentrifugen

Megafuge 10 von der Firma Heraeus Sepatech (Hanau, Deutschland)

Tischzentrifuge 5415 R von der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Zentrifuge Biofuge Stratos von der Firma Heraeus (Nürnberg, Deutschland)

3.5.4 Spektralphotometer

Spektralphotometer DU®640 von der Firma Beckman (Fullerton, USA)

3.5.5 Küvetten

Acrylküvetten von der Firma Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil, Typ 101-QS S, von der Firma Hellma (Müllheim, Deutschland)

3.5.6 Waage

Tischwaage Sartorius CP 255D von der Firma Sartorius (Göttingen, Deutschland)

3.5.7 Tischschüttelgerät

Orbitalshaker Certomat[®]R von der Firma Braun (Nümbrecht, Deutschland)

3.5.8 Sterilbank

Laminaflow Hera safe von der Firma Kendro Laboratory Products (Hanau, Deutschland)

3.5.9 Thermometer

Fluke 65 Handheld Infrared Thermometer von der Firma Fluke Corporation (Everett, USA)

4 Methoden

4.1 Bakterienkulturverfahren

Eine bis drei Bakterienkolonien des Bakterienstammes *S. aureus* wurden steril in 5 ml Müller-Hinton-Bouillon inokuliert und als Übernachtskultur in einem Brutschrank auf einem Horizontalschüttler unter aeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert. Die Probe wurde für 10 Minuten bei 2500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in *Aqua dest.* resuspendiert bis die Suspension eine optische Dichte von 0,6 bei 600 nm besaß, was annähernd 10^6 KBE/ml entspricht.

4.2 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten/KBE als Standardmethode

Es wurden serielle 10-fach-Verdünnungen von 10^{-3} bis 10^{-9} der *S. aureus*-Suspensionen mit Hilfe von 96-Well-Mikrotiterplatten hergestellt. Pro Verdünnungsstufe wurden jeweils 100 µl der Bakteriensuspension auf Müller-Hinton-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C unter aeroben Bedingungen für 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurden durch manuelles Auszählen die koloniebildenden Einheiten (KBE/ml) pro Verdünnungsstufe (Agarplatte) bestimmt.

4.3 Die Miles, Misra & Irwin-Methode

Die Methode nach Miles, Misra & Irwin wurde erstmals im Jahr 1938 beschrieben. Sie ist eine Methode, um die KBE von Bakterien zu bestimmen [124]. Sie wurde von der Forschungsgruppe um Hedges et al. 2002 in ihrer Genauigkeit im Vergleich zu der oben beschriebenen KBE-Standardmethode bestätigt [125].

Bei dieser Methode wurden die Agarplatten in sechs gleichgroße Bereiche eingeteilt und sechs Verdünnungsstufen der zuvor hergestellten seriellen 10-fach-Verdünnungen pro Platte ausplattiert. Somit konnte Material im Vergleich zur oben beschriebenen KBE-Standardmethode gespart werden. Aus einer Bakteriensuspension, die nach dem Bakterienkulturverfahren (siehe 4.1) hergestellt wurde, wurden dreimal 20 µl auf einen Sektor der Agarplatte pipettiert.

Nach einer Übernachtskultur im Inkubator bei 37°C wurden die KBE pro Sektor gezählt und mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor und dem Faktor 1000/60 multipliziert, um die vorhandenen Kolonien auf KBE/ml hochzurechnen.

4.4 Phototoxizitätstests mit TMPyP und *S. aureus* in Suspension

Die benötigten Konzentrationen von TMPyP 2 μM , 20 μM und 200 μM wurden aus einer TMPyP-Stammlösung der Konzentration 500 μM und *Aqua dest.* hergestellt.

Je 200 μl der Bakteriensuspension und 200 μl der verschiedenen PS-Konzentrationen und eine Kontrollprobe der Suspension ohne PS-Zusatz wurden in Reaktionsgefäßen je 1 Minute, 5 Minuten oder 10 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Proben in zwei Durchgängen für 5 Minuten bei 3000 g zentrifugiert und mit *Aqua dest.* gewaschen. Nach dem abschließenden Zentrifugieren für 5 Minuten bei 3000 g wurden die Pellets mit 200 μl *Aqua dest.* resuspendiert. Je 100 μl der erhaltenen Suspensionen wurden in zwei 96-Well-Mikrotiterplatten überführt, um serielle 10-fach-Verdünnungen für jede Probe herzustellen.

Eine Mikrotiterplatte wurde als Dunkelkontrolle bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert. Die andere wurde zur Photosensibilisierung der Bakterien mit der Lampe OmniCure® Series 2000 (λ_{em} 390 - 500 nm) bestrahlt. Die Leistung von 50 mW/cm^2 wurde für 210 Sekunden appliziert, was einer Energie von 10,5 J/cm^2 entspricht. Daraufhin wurde die KBE-Standardmethode für die Verdünnungen 10^{-3} , 10^{-5} und 10^{-7} der bestrahlten und nicht bestrahlten Bakteriensuspensionen durchgeführt.

4.5 Herstellung der Cellulose-Acetat-Oberflächen

4.5.1 Herstellung der CA-Oberfläche

Die CA-Oberfläche wurde nach der Forschungsgruppe von Valérie Decraene et al. in einer Glaspetrischale mit einem Durchmesser von 5 cm mit 360 mg CA-Pulver und 7 ml Aceton zu der Konzentration von 50 mg/ml hergestellt [117]. Das Gemisch in der abgedeckten Petrischale wurde für 48 Stunden unter dem Abzug bei Raumtemperatur (lichtgeschützt) zum Aushärten gelegt (**Abb. 17**).



Abb. 17: Darstellung der CA-Oberfläche ohne PS: Durchmesser 5 cm, 50 mg/ml CA mit Aceton.

4.5.2 Einarbeitung der Photosensibilisatoren in die CA-Oberfläche

Zur Einarbeitung der PS wurden bei der Herstellung der CA-Oberflächen die gelösten PS hinzu pipettiert, um die gewünschten Konzentrationen der PS in den Kunststoffplatten von je 250 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM und 10 μM zu erhalten. TMPyP, MB und TBO wurden in *Aqua dest.*, TPP und PN-Cl in Benzol, MB-S1 und MB-S3 in DMSO und MB-S2 in Aceton gelöst.

Um eine gleichmäßige Verteilung des jeweiligen PS in der CA-Oberfläche zu gewährleisten wurden die abgedeckten Glaspetrischalen unter dem Abzug auf einen Orbitalshaker gestellt, der die Gemische für 24 Stunden bewegte. Nach 48 Stunden waren die Kunststoffplatten im Dunkeln ausgehärtet und konnten aus der Petrischale entnommen werden (**Abb. 18**).

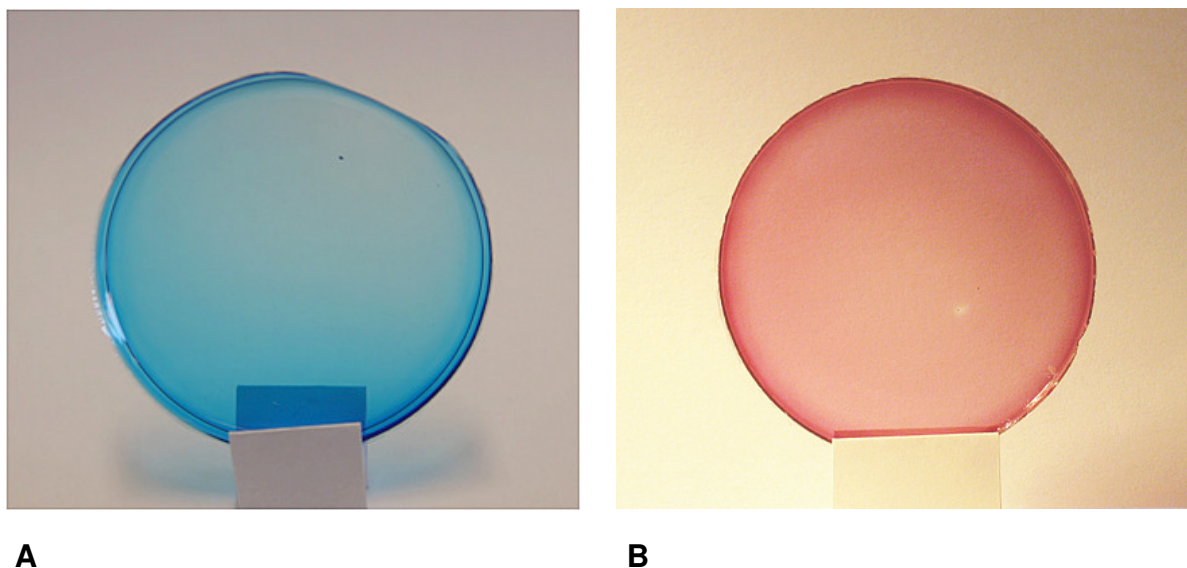


Abb. 18: Darstellung der CA-Oberflächen mit MB (50 μM) (**A**) und TPP (250 μM) (**B**): Durchmesser 5 cm, 50 mg/ml CA mit Aceton.

4.6 Spektroskopische Untersuchungen der Cellulose-Acetat-Oberflächen

4.6.1 Spektroskopische Untersuchungen der CA-Oberflächen mit PS

Es wurde mit Hilfe des Spektralphotometers DU®640 im Wellenlängenbereich von 200 - 1000 nm gemessen. Zunächst wurde das Spektralphotometer durch die Messung der CA-Oberfläche ohne PS geeicht. Die Kunststoffplatten wurden in 1,5 cm breite Scheiben zugeschnitten und diagonal in eine Präzisionsglasküvette gestellt, sodass der Lichtstrahl des Spektralphotometers im 45°-Winkel auf die Oberfläche traf. Die Absorptionsspektren der Farbstoffe TMPyP, MB, TBO, TPP, MB-S2, MB-S3 und PN-Cl eingearbeitet in die CA-Oberflächen wurden gemessen. Die erhaltenen Absorptionsspektren der PS in den Oberflächen wurden mit denen der PS in Suspension verglichen.

4.6.2 Messungen des Farbstoffaustritts aus der CA-Oberfläche

Die spektroskopischen Messungen erfolgten mit dem Spektralphotometer DU®640 im Wellenlängenbereich von 200 - 1000 nm. Die Eichung und der Versuchsaufbau erfolgten wie in Kapitel 4.6.1. Die Absorptionsspektren der Farbstoffe TMPyP, MB, TBO, TPP, MB-S2, MB-S3 und PN-Cl in den CA-Oberflächen wurden detektiert. Anschließend wurden die CA-Oberflächen mit den eingearbeiteten Farbstoffen einschließlich der CA-Oberfläche ohne PS in 10 ml *Aqua dest.* als Lösungsmittel gelegt. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde je 1 ml des *Aqua dest.* in einer Acrylküvette spektroskopisch auf gelöste Farbstoffpartikel untersucht. Darauf folgte die erneute spektroskopische Messung der einzelnen PS in den CA-Platten nach der nochmaligen Eichung des Spektroskops mit der CA-Oberfläche ohne PS. Die Spektren der PS in den CA-Oberflächen wurden vor und nach der Inkubation in *Aqua dest.* hinsichtlich einer Abnahme der Maximalabsorption verglichen.

4.6.3 Langzeitbestrahlung der CA-Oberfläche ohne und mit TPP

Die CA-Oberfläche ohne PS und die mit TPP (250 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM) wurden vor und nach der Bestrahlung mit der Lampe OmniCure®Series 2000 (λ_{em} 390 - 500 nm) spektroskopisch untersucht (**Abb. 19**). Die applizierte Gesamtenergie bei einer Leistung von 50 mW/cm² und einer Bestrahlungsdauer von 10 Minuten, 40 Minuten und 100 Minuten betrug jeweils 30 J/cm², 120 J/cm² und 300 J/cm². Als Referenzpunkt zur Bestimmung der Abnahme der Absorptionsmaxima wurden die Absorptionsspektren der unbestrahlten TPP-CA-Oberflächen mit den unterschiedlichen Konzentrationen verwendet.

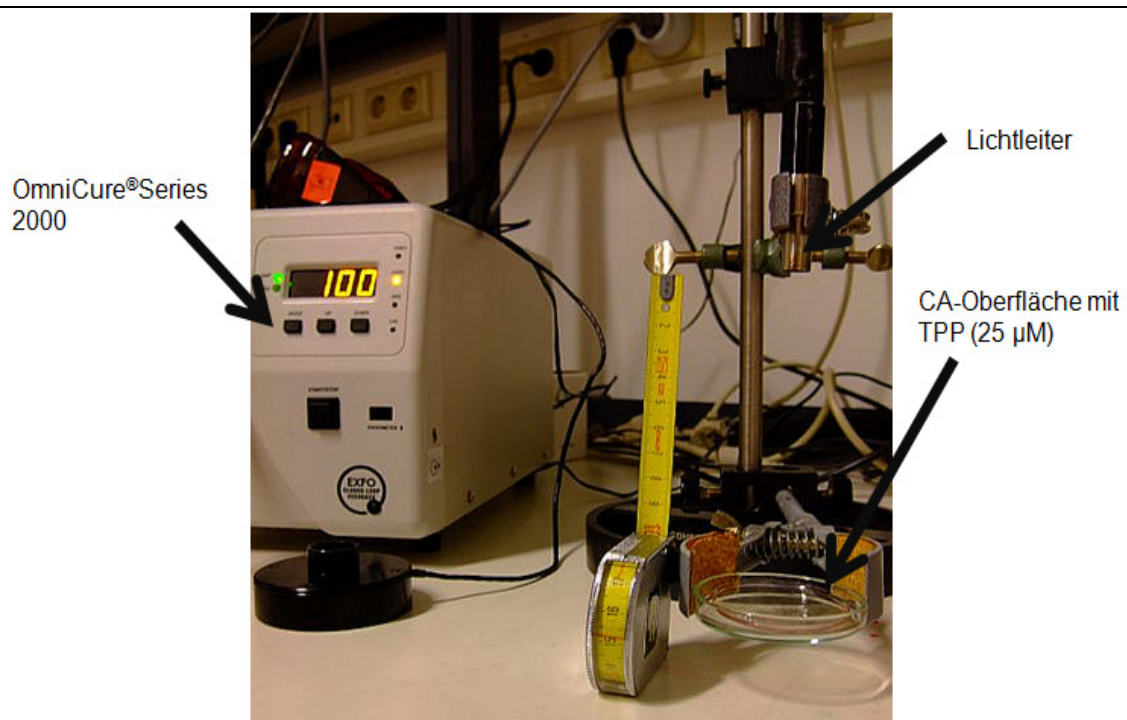
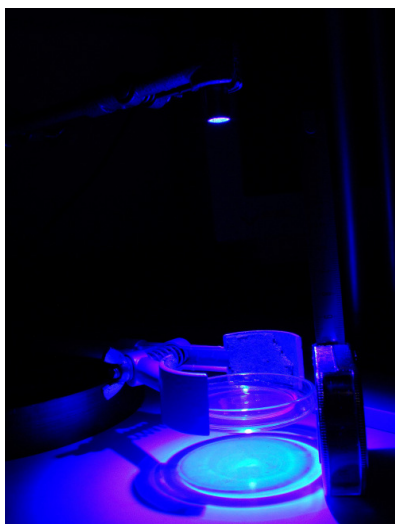
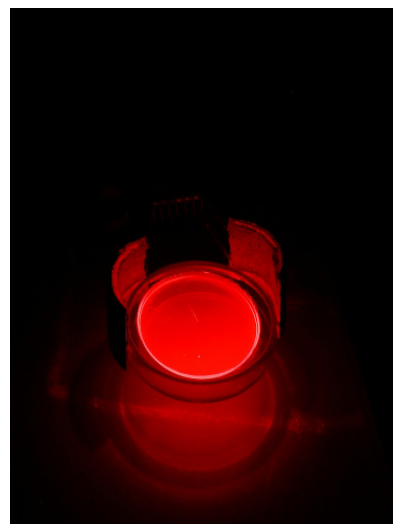


Abb. 19: Darstellung des Versuchsaufbaus zur Bestrahlung der CA-Oberflächen: Zur Bestrahlung wurden die Kunststoffoberflächen in eine Glaspetrischale gelegt. Die Glaspetrischale war mit einem Stativ fixiert, sodass der Lichtstrahl der Lampe OmniCure® Series 2000 immer auf den Mittelpunkt der CA-Oberfläche positioniert war. Diese Versuchsvorrichtung wurde ebenfalls für die Lampe Teclas Source, Filter 2 eingesetzt.



A



B

Abb. 20: Darstellung der Bestrahlung der CA-Oberfläche mit TPP (25 µM) (**A**) und Aufnahme der CA-Oberfläche mit TPP (25 µM) (**B**) mit einem Kantenfilter, der den blauen und gelben Spektralbereich abschneidet und somit das Emissionsspektrum von TPP zeigt; Lampe: OmniCure® Series 2000 mit 50 mW/cm²

4.7 Singulett-Sauerstoff-Messung an CA-Oberflächen mit PS

Die Singulett-Sauerstoff-Messungen der CA-Oberflächen erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Bäuml (Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg) und wurden von Dr. rer. physiol. A. Felgenträger durchgeführt. Die Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz wurde direkt zeit- und spektralaufgelöst im nahinfraroten Bereich (1270 nm) detektiert, indem die PS MB, TPP und TMPyP eingearbeitet in die CA-Oberflächen, mit gepulsten Lasern bestrahlt wurden. Hierbei wurde das Prinzip der zeitkorrelierten Einzelphoton-Zählungen (single photon counting) verwendet (**Abb. 21**) [126]. Mit dieser Methode kann die Singulett-Sauerstoff-Abklingzeit τ_{Δ} , die Deaktivierungszeit des Triplet (T_1)-Zustands des PS τ_T und die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} , die die Effektivität der Singulett-Sauerstoff-Generierung anzeigt, bestimmt werden.

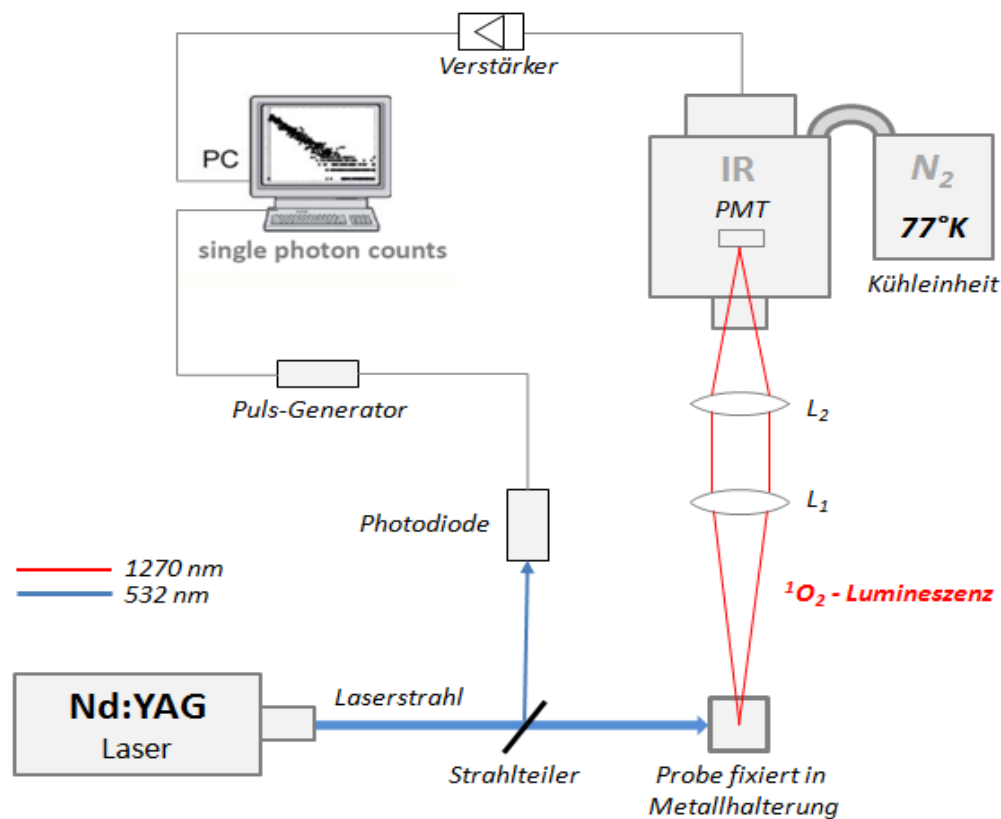


Abb. 21: Versuchsaufbau für die direkte Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei 1270 nm. Ein Nd:YAG Laser (50 mW) bestrahlt (blaue Linie) die Probe direkt an Luft. Die Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz (rote Linie) wird mit einem infrarotsensitiven Photomultiplier (PMT) gemessen nach der Passage des Linsensystems (L1, L2) und der Filter. Das Signal des PMT wird verstärkt und parallel mit dem Signal des Pulsgenerators an den Computer gesendet, um der Messung einen zeitlichen Startpunkt zu vermitteln [modifiziert nach [127]].

Die direkte Messung des Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignals wurde durch zeitaufgelöste Messungen bei 1270 nm (Filter: FWHM = 10 nm bzw. 30 nm) durchgeführt [126]. Die Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz wurde im Vergleich zu dem anregenden Strahl rückwärtsgerichtet mit einem PMT gemessen. Dabei wurde ein Kantenfilter bei 950 nm vorgeschaltet, um die Detektion von Störphotonen zu minimieren.

Zur Anpassung des Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignals wurde C verwendet, das die Deaktivierung des angeregten T_1 -Zustands des PS durch Sauerstoff im Grundzustand (3O_2) darstellt [128].

$$C = [T_1]_{t=0} \cdot k_{T_1} \cdot [^3O_2]$$

Die zeitabhängige Lumineszenzintensität $I(t)$ wurde mit folgender Formel beschrieben:

$$I(t) = \frac{C}{t_R^{-1} - t_D^{-1}} \left[\exp\left(-\frac{t}{t_D}\right) - \exp\left(-\frac{t}{t_R}\right) \right]$$

Dabei beschrieben t_R und t_D die Anstiegs- und Abklingzeit, die entweder der Deaktivierungszeit des PS- T_1 -Zustandes τ_T oder der Deaktivierungszeit des Singulett-Sauerstoffs τ_Δ zugeordnet wird. Mittels des Levenberg-Marquard-Algorithmus wurde in Mathematica (Mathematica 5.2, Wolfram Research, Champaign, USA) die Abweichung der Messpunkte von der theoretischen Fitkurve $I(t)$ minimiert. Die exakten mathematischen Beschreibungen und die Deviation der Formel für die Lumineszenzintensität $I(t)$, welche für die Ermittlung von t_R und t_D benutzt wurde, können in der Literatur nachgelesen werden und sind nicht Gegenstand der vorliegenden Doktorarbeit [126].

Die Anstiegs- und Abklingzeit der zeitaufgelösten Lumineszenz sind von der Sauerstoffkonzentration in der Umgebung abhängig. Zudem lässt sich mit der Singulett-Sauerstoff-Abklingzeit die Diffusionsreichweite von Singulett-Sauerstoff abschätzen [127].

Die freie Weglänge x_{Diff} eines diffundierenden Gaspartikels berechnet sich aus folgender Gleichung:

$$x_{Diff} = \sqrt{6Dt}$$

Dabei beschreibt D die lösungsmittelspezifische Diffusionskonstante und t die aus den zeitaufgelösten Lumineszenzsignalen ermittelte Deaktivierungszeit bzw. Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff. Die Deaktivierung von Singulett-Sauerstoff ist abhängig von der Umgebung. So ist Wasser ebenso wie Luft ein Quencher, der zu einer charakteristischen Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer τ_{Δ} beiträgt [127].

Die Untersuchung der CA-Oberflächen mit den PS erfolgte an Luft bei einer Raumtemperatur von 25°C und einem Umgebungsdruck von 1013 hPa. Die Oberflächen wurden dazu in eine Metallhalterung vor den PMT in einem 45°-Winkel eingespannt. Die Sauerstoffkonzentrationen in den Proben konnten nicht gemessen werden, da die Permeabilitätseigenschaften des CA-Materials für unterschiedliche Gase bislang nicht untersucht wurden.

Exemplarisch wurde Singulett-Sauerstoff durch Bestrahlung der TMPyP-CA-Oberfläche generiert und dessen Lumineszenz mit Interferenzfiltern im Wellenlängenbereich von 1150 – 1400 nm, die vor den PMT geschaltet waren, spektroskopisch aufgelöst.

Wenn molekularer Sauerstoff vom Singulett-Zustand in seinen Grundzustand übergeht, liegt das Lumineszenzmaximum bei 1268 nm in Wasser und bei 1274 nm in Ethanol [126].

4.8 Biologische Versuche mit den CA-Oberflächen und *S. aureus*

4.8.1 Bestimmung der Wiederfindungsrate der Bakterien

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der Bakterien und zur Abschätzung des systematischen Fehlers, bedingt durch die manuelle Abtragung der Bakterien, wurden 50 µl der Bakteriensuspension, siehe Kapitel 4.1, auf die Kunststoffoberflächen ohne PS, mit TBO oder mit TPP pipettiert.

Die Platten mit den Bakterientropfen wurden zum Antrocknen bei Raumtemperatur lichtgeschützt für zwei Stunden offen unter die Sterilbank gestellt. Die Abtragung der Bakterien erfolgte mit einem sterilen Wattestäbchen getränkt in Müller-Hinton-Boullion. Die aufgenommenen Bakterien wurden in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml Müller-Hinton-Boullion überführt. Dieser Vorgang wurde fünfmal pro Bakterientropfen durchgeführt.

Als Kontrolle ($\triangleq 100\%$ der Bakterien, Ausgangsbakterienmenge ohne Auftragen auf die CA-Oberfläche als Referenzpunkt) wurden 50 µl der Bakteriensuspension in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml Müller-Hinton-Boullion pipettiert.

100 µl jeder Probe wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt und es folgte die Herstellung der seriellen 10-fach-Verdünnungsreihen. Die Auszählung der KBE/ml nach einer Übernachtskultur erfolgte nach der Methode von Miles, Misra & Irwin [124].

4.8.2 Phototoxizitätsversuche mit den CA-Oberflächen

Für diese Experimente wurden die CA-Oberflächen mit den lipophilen PS TPP, MB-S2, MB-S3, PN-Cl (je 250 µM, 100 µM, 10 µM) und dem hydrophilen Farbstoff TBO (100 µM, 50 µM, 25 µM) verwendet. Zur Vorbereitung der CA-Oberfläche ohne PS und mit PS wurden die Bakterienproben wie in der Methode zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der Bakterien aufgetragen (**Abb. 22**).

Die Bestrahlung der CA-Platten mit PS erfolgte mit den Lampen, deren Emissionsspektren den größten Anteil des maximalen Absorptionsbereichs der PS abdeckten. Dementsprechend wurden die Bakterienproben auf den TPP-CA-Oberflächen mit der Lampe OmniCure® Series 2000 (λ_{em} 390 – 500 nm), die mit den Phenothiazinderivaten mit der Lampe Teclas Source, Filter 2 (λ_{em} 550 - 750 nm) und die mit PN-Cl mit der Lampe UV 236 Waldmann Medizintechnik (λ_{em} 380 – 480 nm) bestrahlt.

Für jeden Phototoxizitätsversuch wurden neuhergestellte Kunststoffplatten verwendet.

Als Kontrollen wurden die mit Bakterien kontaminierten CA-Oberflächen ohne PS bestrahlt und kontaminierte CA-Oberflächen ohne und mit PS nicht bestrahlt (Dunkelkontrolle). Diese Kontrollen wurden für alle getesteten Bedingungen gleichermaßen durchgeführt (**Tabelle 2**).

	CA-Oberflächen	
	PS	Licht
Kontrolle	-	-
Dunkelkontrolle	+	-
Licht	-	+
PIB	+	+

+: mit Licht oder PS, -: ohne Licht oder ohne PS

Tabelle 2: Darstellung der Kontrollen für die Phototoxizitätstests mit *S. aureus* auf den CA-Oberflächen

Die Phototoxizität der TPP-Oberflächen (250 μM , 100 μM , 10 μM) wurde mit der Lampe OmniCure®Series 2000 (λ_{em} 390 – 500 nm) unter verschiedenen Bedingungen getestet (**Tabelle 3**).

	TPP-CA-Oberfläche						
	Leistung/cm ²						
	50 mW			30 mW	10 mW		5 mW
Dauer	60 Min	30 Min	10 Min	10 Min	60 Min	10 Min	100 Min
Energie/cm ²	180 J	90 J	30 J	18 J	36 J	6 J	30 J

Tabelle 3: Darstellung der verschiedenen Bedingungen für die Testung der CA-Oberflächen mit TPP (250 μM , 100 μM , 10 μM); Lampe OmniCure®Series 2000

Zusätzlich wurde mit den TPP-CA-Oberflächen (250 μM , 100 μM , 10 μM) eine fraktionierte Bestrahlung durchgeführt. Dabei wurde fünfmal eine Intensität von je 10 mW/cm² appliziert und jedes Bestrahlungsintervall dauerte 10 Minuten. Daraus resultierte eine Gesamtenergie von 30 J/cm². Zwischen jedem Bestrahlungsintervall wurde eine Pause von 5 Minuten eingehalten.

Die CA-Oberflächen MB-S2 und MB-S3 (je 250 μM , 100 μM , 10 μM) wurden mit der Lampe Teclas, Filter 2 (λ_{em} 550 - 750 nm) bestrahlt (**Tabelle 4**).

	MB-S2-CA-Oberfläche				MB-S3-CA-Oberfläche
	Leistung/cm ²				
	50 mW				
Dauer	30 Min	20 Min	10 Min		10 Min
Energie/cm ²	90 J	60 J	30 J		30 J

Tabelle 4: Darstellung der überprüften Bedingungen für die CA-Oberflächen, die MB-S2 und MB-S3 (je 250 μM , 100 μM , 10 μM) enthielten; Lampe Teclas Source, Filter 2

Mit den PN-CI-Oberflächen (250 μM , 100 μM , 10 μM) wurden die Versuche mit der Lampe UV 236 Waldmann Medizintechnik (λ_{em} 380 – 480 nm) bei 15 mW/cm² und 6 mW/cm² durchgeführt (**Tabelle 5**).

	PN-CI-CA-Oberfläche	
	Leistung/cm ²	
	15 mW	6 mW
Dauer	33,3 Min	83,3 Min
Energie/cm ²	30 J	

Tabelle 5: Darstellung der getesteten Bedingungen mit den PN-CI-CA-Oberflächen (250 μM , 100 μM , 10 μM); Lampe UV 236 Waldmann Medizintechnik

Die TBO-Kunststoffoberflächen (100 μM , 50 μM , 10 μM) wurden mit 50 mW/cm^2 Intensität (Lampe Teclas Source, Filter 2) bestrahlt (**Tabelle 6**).

	TBO-CA-Oberfläche
	Leistung/ cm^2
	50 mW
Dauer	10 Min
Energie/ cm^2	30 J

Tabelle 6: Darstellung der getesteten Bedingungen für die CA-Oberflächen mit TBO (100 μM , 50 μM , 10 μM) enthalten; Lampe Teclas Source, Filter 2

Die Abtragung der bestrahlten und nicht bestrahlten Bakterienproben auf den CA-Oberflächen wurde gemäß der Methode zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der Bakterien durchgeführt, siehe Kapitel 4.8.1.

Es wurden serielle 10-fach-Verdünnungen in 96-Well-Mikrotiterplatten hergestellt und die KBE/ml nach der Miles, Misra & Irwin-Methode kultiviert und nach einer Übernachtskultur ausgezählt [124].

Zur Überprüfung des Bakterienverlusts durch die manuelle Abtragung der Bakterienproben wurde bei jedem Versuch eine Kontrollprobe, die 100% der Bakterien also der Ausgangsbakterienmenge ohne Auftragen auf die CA-Oberfläche als Referenzpunkt entspricht, mitgeführt.

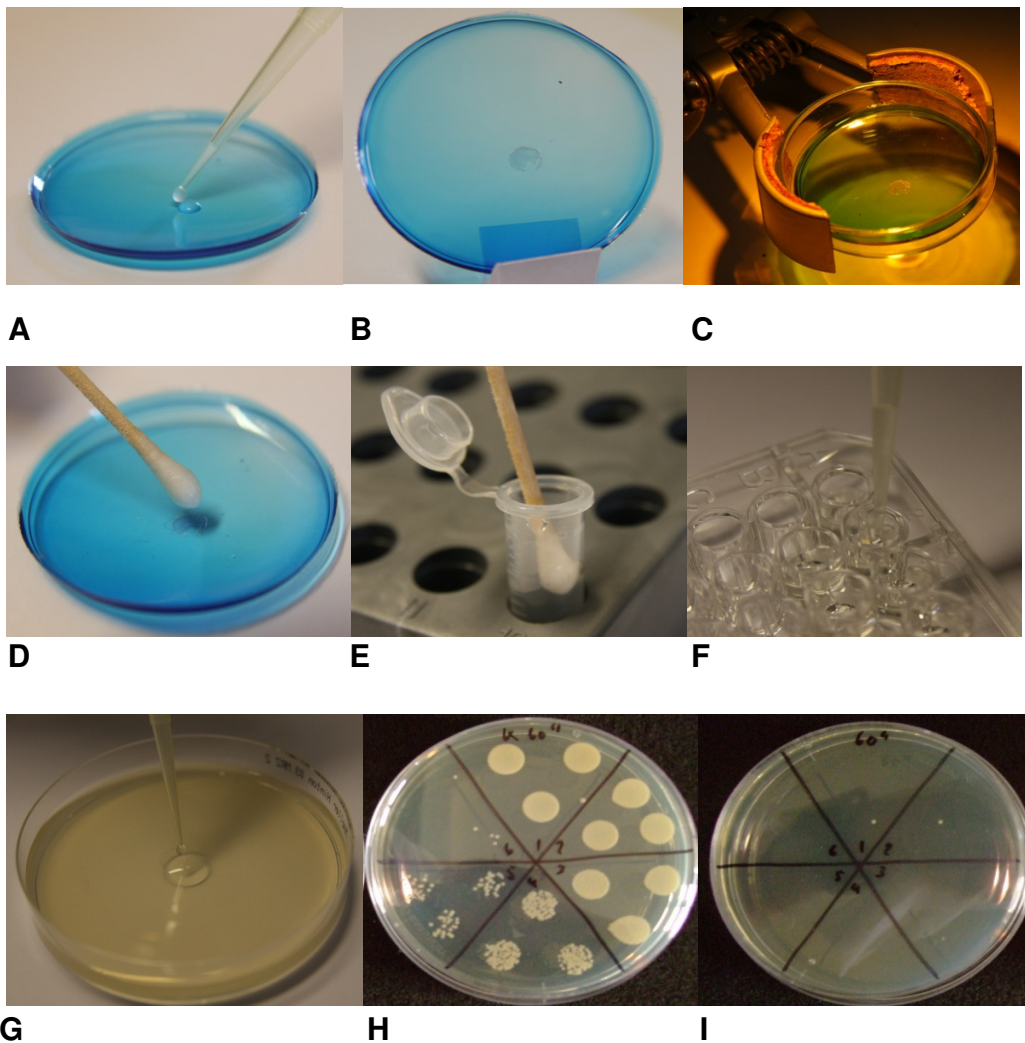


Abb. 22: Darstellung des Versuchsablaufs (Fotos © by Francesco Santarelli, Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg):

- A)** Pipettieren der Bakteriensuspension (50 μ l) auf die zu bestrahlende CA-Oberfläche, in die der PS MB (50 μ M) eingearbeitet wurde
- B)** Getrockneter Bakterientropfen auf der CA-Oberfläche nach 2 Stunden
- C)** Bestrahlung der Oberfläche mit sichtbarem Licht (Lampe Teclas Source, Filter 2)
- D)** Abtragung der Bakterien zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der Bakterien
- E)** Überführen der abgetragenen Bakterien in Müller-Hinton-Boullion
- F)** Bestimmung der KBE durch serielle 10-fach-Verdünnungsreihen (96-well Format)
- G)** Auftragen der seriellen Verdünnungsreihen auf Agarplatten
- H)** Bestimmung der überlebenden Kolonien der Dunkelkontrolle mit PS ohne Bestrahlung nach der Miles, Misra & Irwin-Methode
- I)** Bestimmung der überlebenden Kolonien der bestrahlten Oberfläche mit PS nach der Miles, Misra & Irwin-Methode

4.9 Datenanalyse

Alle Ergebnisse der Phototoxizitätstests wurden mit Hilfe des Auswertprogramms GraphPadPrism 4 (La Jolla, Californien, USA) ermittelt und als Mediane mit der 25% und 75% Quartile dargestellt.

Insgesamt werden Werte von drei unabhängigen Versuchen pro durchgeführtem Phototoxizitätstest ($n = 3$) gezeigt. Als Referenz für die Berechnung wurden Kontrollen, die nicht mit Licht bestrahlt (Dunkelkontrolle) wurden, verwendet.

In den **Abb. 24** und **37-41** zeigen die Mediane, die unter der horizontalen grünen Linie liegen, eine Reduktion der Bakterien um $\geq 99,9\%$ ($3 \log_{10}$ -Stufen) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Bakterien auf CA-Oberflächen ohne PS).

5 Ergebnisse

5.1 Phototoxizitätstests mit TMPyP und *S. aureus* in Suspension

Der Referenzfarbstoff TMPyP wurde hinsichtlich seiner phototoxischen Eigenschaften gegenüber *S. aureus* in Suspension überprüft, um das Prinzip der PIB zu veranschaulichen.

Für die Phototoxizitätstests wurden die Bakterienproben ohne und mit TMPyP (1 μM , 10 μM , 100 μM) für 1 Minute, 5 Minuten und 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit einer Leistung von 50 mW/cm^2 für 210 Sekunden (10,5 J/cm^2) mit der Lampe OmniCure® Series 2000 (λ_{em} 390 - 500 nm) bestrahlt.

Nach den Richtlinien für Händehygiene im Gesundheitswesen wurde die phototoxische Effektivität gegenüber Bakterien nach Bestrahlung festgelegt. Gemäß diesen Richtlinien entsprechen folgende Reduktionen der KBE/ml den angegebenen Zahlen für die Effektivität [72, 129].

Reduktion der KBE/ml um 1 \log_{10} -Stufe \triangleq 90% Effektivität

Reduktion der KBE/ml um 3 \log_{10} -Stufen \triangleq 99,9% Effektivität

Reduktion der KBE/ml um 5 \log_{10} -Stufen \triangleq 99,999% Effektivität

Zur Zulassung muss ein Desinfektionsmittel zu einer Reduktion der KBE/ml um mindestens 5 \log_{10} -Stufen führen.

Um festzustellen, wie stark die Bakterien im applizierten Wellenlängenbereich absorbieren, wurde die Absorption einer *S. aureus*-Suspension mit Hilfe des Spektralphotometers DU®640 im Wellenlängenbereich von 200 - 1000 nm bestimmt (**Abb. 23**).

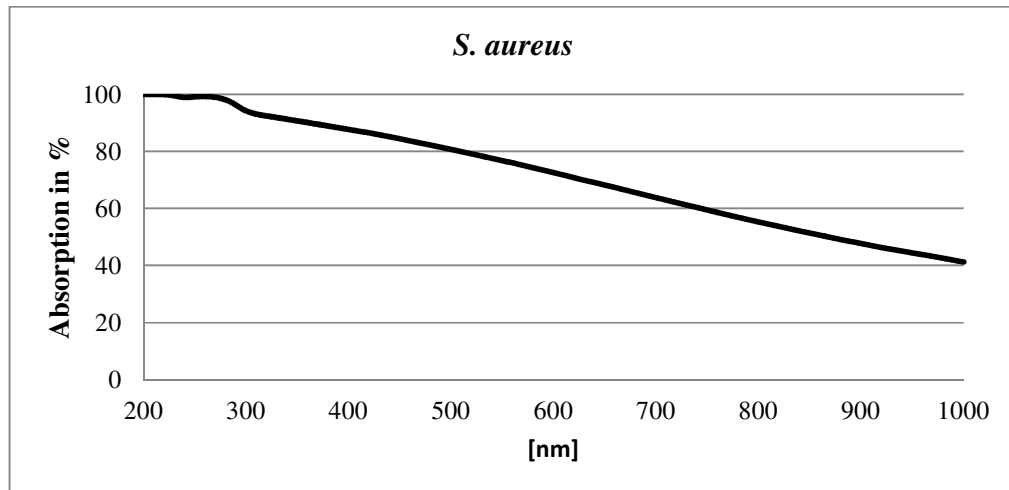
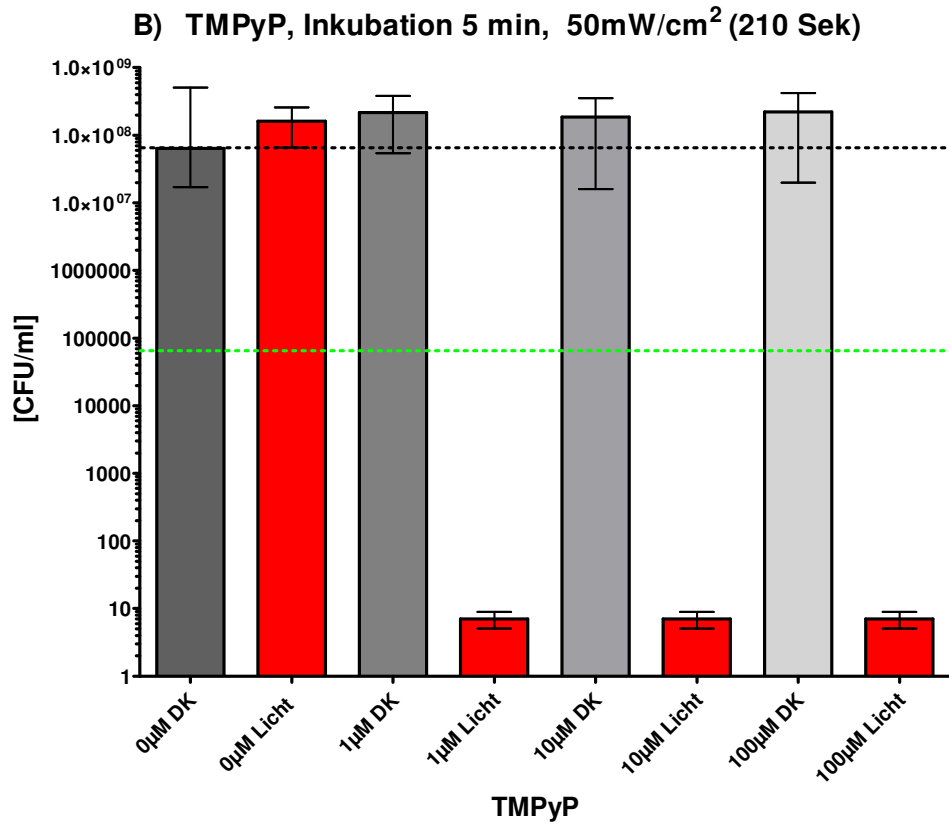
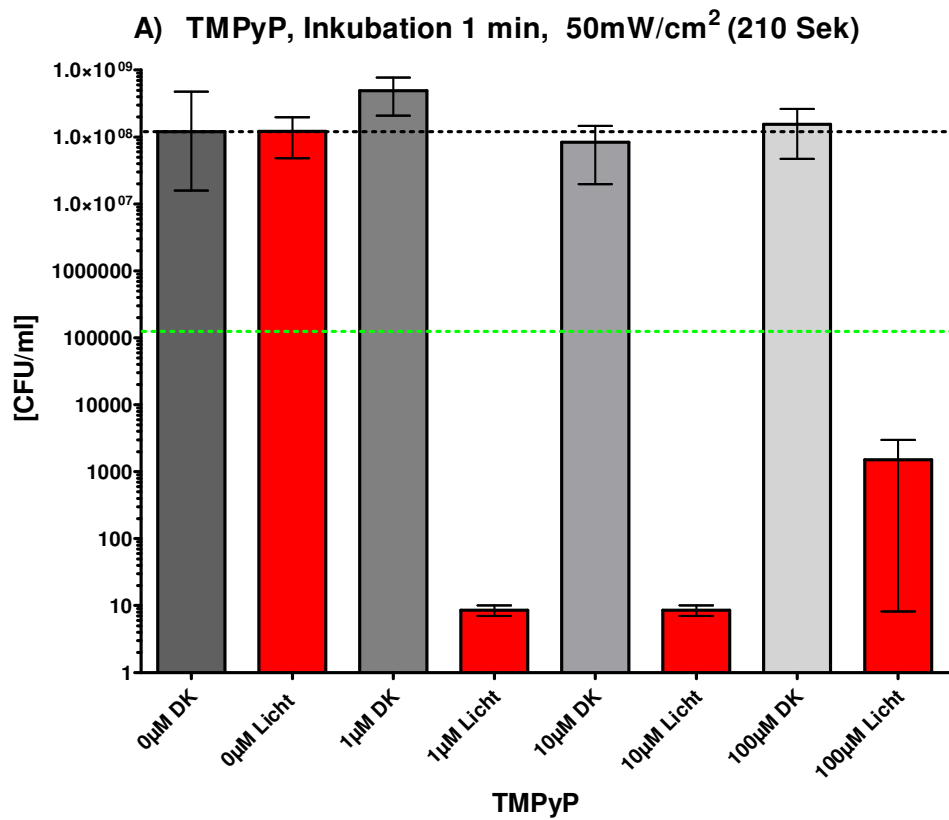


Abb. 23: Absorptionsspektrum der *S. aureus*-Suspension (10^6 KBE/ml) mit *Aqua dest.*

Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an überlebendem *S. aureus* bei allen Inkubationszeiten mit TMPyP ab einer TMPyP-Konzentration von $1 \mu\text{M}$ mit anschließender Bestrahlung um bis zu 7 \log_{10} -Stufen reduziert werden kann. Somit ist die phototoxische Desinfektion gewährleistet und die Voraussetzungen für den klinischen Einsatz sind gegeben (**Abb. 24**).

Ohne Bestrahlung zeigte der Zusatz von TMPyP zu der Bakteriensuspension keine toxische Wirkung auf die Bakterien. Die Bakterien ohne vorherige Inkubation mit TMPyP vermehrten sich nach der Belichtung normal.



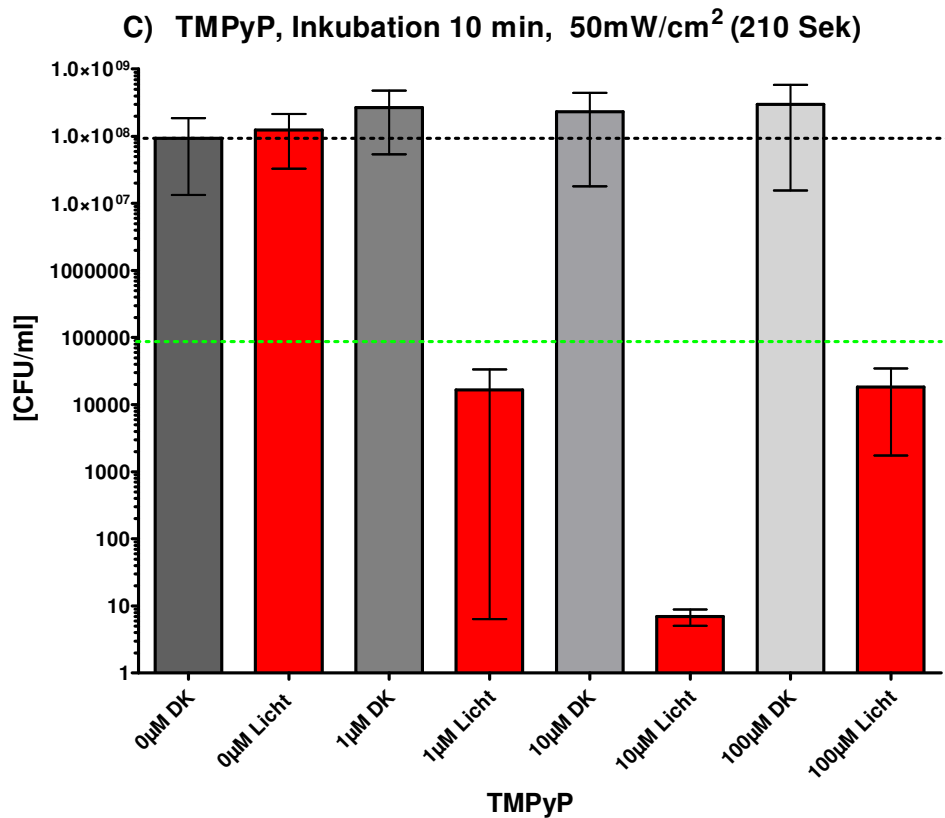


Abb. 24: Phototoxizität von TMPyP gegenüber *S. aureus* bei verschiedenen Inkubationszeiten (applizierte Lichtdosis 10,5 J/cm²). Die Bakteriensuspensionen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von TMPyP (100 µM, 10 µM, 1 µM) für 1 Minute (A), für 5 Minuten (B) und für 10 Minuten (C) inkubiert. Rote Balken: bestrahlte Bakterien ohne und mit TMPyP, graue Balken: Dunkelkontrolle: Bakterien ohne und mit TMPyP ohne Bestrahlung; die Balken repräsentieren den Median von drei unabhängigen Experimenten, die die 25% und 75% Quartile enthalten. Werte unter der horizontalen grünen Linie entsprechen einer Reduktion der Bakterien um ≥99,9% (3 log₁₀-Stufen).

5.2 Herstellung der CA-Oberflächen mit PS

Zur Einarbeitung in die CA-Oberfläche wurden bei der Herstellung der Oberflächen die PS hinzu pipettiert. Es wurden Platten mit den Konzentrationen 250 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM und 10 μM hergestellt. CA-Oberflächen mit MB-S1 konnten nicht hergestellt werden, da der Farbstoff mit Aceton reagierte und sich braun verfärbte (Tabelle 7).

CA-Oberflächen mit Photosensibilisatoren						
		Konzentrationen [μM]				
		250	100	50	25	10
Photosensibilisatoren	TPP	+	+	+	+	+
	PN-Cl	+	+	+	+	+
	MB-S1	-	-	-	-	-
	MB-S2	+	+	+	+	+
	MB-S3	+	+	+	+	+
	MB	-	-	+	+	+
	TBO	-	+	+	+	+
	TMPyP	-	-	+	+	+

+: hergestellt, -: keine Herstellung

Tabelle 7: Übersicht über die hergestellten CA-Oberflächen mit PS; Trennlinie: oberhalb: lipophile PS TPP, PN-Cl, MB-S2 und MB-S3; unterhalb: hydrophile PS MB, TBO und TMPyP;

Die hydrophilen PS TBO, MB und TMPyP reagierten aufgrund ihres hydrophilen Lösungsverhaltens mit dem lipophilen CA-Aceton-Gemisch bei höheren Konzentrationen des gelösten Farbstoffes. Diese CA-Oberflächen wurden instabil und die PS konnten sich nicht gänzlich in das Polymer integrieren. Beispielsweise wurden durch die Mischung von TMPyP (in *Aqua dest.*) mit dem hydrophoben Aceton die Oberflächen bei der Aushärtung trüb (**Abb. 25**) und waren sowohl für die spektroskopischen Messungen als auch für die Phototoxizitätstests ungeeignet.

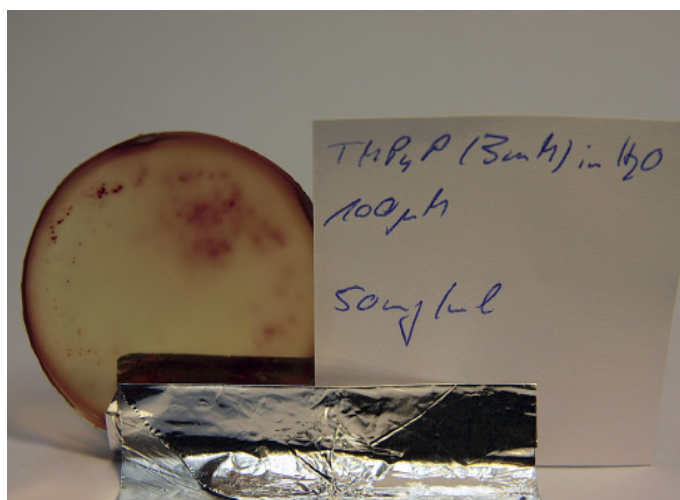


Abb. 25: Darstellung der CA-Oberfläche mit TMPyP (100 µM); ungleichmäßige Verteilung von TMPyP und partielle Eintrübung der CA-Oberfläche

5.3 Spektroskopische Untersuchungen der Cellulose-Acetat-Oberflächen

5.3.1 Spektroskopische Untersuchungen der CA-Oberflächen mit PS

Um festzustellen, ob sich die PS-Moleküle in der CA-Matrix verändern oder aggregieren, wurden die Absorptionsspektren der PS in Lösung und eingearbeitet in die Oberfläche hinsichtlich einer Verschiebung der Absorptionsmaxima (**Tabelle 8**) und einer Verminderung der maximalen Absorption (in %) (**Tabelle 9**) miteinander verglichen. Exemplarisch wurden dabei die Oberflächen mit PS mit einer Konzentration von 25 μM verwendet.

		Absorptionsmaxima [nm]	
		in Lösung	in der CA-Oberfläche
Photosensibilisatoren	TMPyP	412,5 - 432	430,5
	TPP	415,5 - 429	415,5 - 418,5
	MB	663,5	292 / 666
	TBO	625,5	288,5 / 631
	MB-S2	656,5	281 / 665,5
	MB-S3	321,5 / 616,5	232,5 / 608
	PN-CI	387	393,5

Tabelle 8: Übersicht über die Absorptionsmaxima [nm] der einzelnen PS (je 25 μM) in Lösung und in der CA-Oberfläche; **fettgedruckt:** zusätzlicher Absorptionspeak im UV-Bereich

Bei den Porphyrinderivaten TMPyP und TPP verschiebt sich der Bereich der Maximalabsorption nicht. Jedoch verschmälert sich eingearbeitet in die Polymermatrix der maximale Absorptionsbereich (99,97% Absorption) beider PS und zeigt somit eine Aggregation der PS-Moleküle in der CA-Oberfläche im Vergleich zu den PS im Lösungsmittel an. In Suspension zeigen die maximalen Absorptionsbanden einen breiten Schwingungsbereich. Eingebettet in die CA-Oberfläche sind die Freiheitsgrade der PS-Moleküle geringer und die Schwingungsbreite ist vermindert [130].

Bei den Phenothiazinderivaten und bei PN-Cl verschieben sich die Absorptionsmaxima, was ebenfalls auf eine Aggregation der Moleküle in der Polymermatrix schließen lässt, wodurch weniger PS-Moleküle Licht der entsprechenden Wellenlängen absorbieren können und angeregt werden.

Bei MB beträgt die Verschiebung 2,5 nm, bei TBO 5,5 nm, bei MB-S2 9 nm, bei MB-S3 8,5 nm und bei PN-Cl 6,5 nm. Zudem lässt sich bei den PS MB, TBO und MB-S2 ein zusätzliches Absorptionsmaximum in den CA-Oberflächen im UV-Bereich detektieren (**Tabelle 8**).

		maximale Absorption in %	
		in Lösung	in der CA-Oberfläche
Photosensibilisatoren	TMPyP	99,98	85,6
	TPP	99,98	99,97
	MB	98,73	84,21 / 95,46
	TBO	88,62	40,16 / 46,78
	MB-S2	95,49	67,08 / 66,13
	MB-S3	52,12 / 34,68	84,37 / 12,87
	PN-Cl	46,85	8,83

Tabelle 9: Übersicht über die Absorption in % der Absorptionsmaxima jedes PS (je 25 µM) in Lösung und in der CA-Oberfläche; **fettgedruckt:** zusätzlicher Absorptionspeak im UV-Bereich

Bis auf das Absorptionsmaximum von TPP verringern sich alle Maxima, sobald die PS in die CA-Matrix eingearbeitet sind.

Die Verminderung der Absorption beträgt bei TMPyP 14,38%, bei MB 3,27%, bei TBO 41,84%, bei MB-S2 29,36%, bei MB-S3 21,81% und bei PN-Cl 38,42% (**Tabelle 9**). Dies lässt darauf schließen, dass nicht die gleiche Anzahl an PS-Molekülen von TMPyP, MB, TBO, MB-S2, MB-S3 und PN-Cl in der Polymermatrix gebunden werden können, wie in Lösung der gleichen Konzentration. Dadurch können nicht genauso viele Farbstoffmoleküle angeregt werden und die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute ist möglicherweise geringer.

Das Auftreten eines weiteren Absorptionspeaks im UV-Bereich und die Minderung der maximalen Absorption der PS TMPyP, MB, TBO, MB-S2, MB-S3 und PN-Cl in den CA-Oberflächen könnte auf eine strukturelle Veränderung der PS nach der Einarbeitung in die Polymermatrix hindeuten.

5.3.2 Farbstoffaustritt aus den CA-Oberflächen

Um zu überprüfen, ob sich PS-Moleküle aus der CA-Oberfläche herauslösen und direkt mit den Mikroorganismen auf der Oberfläche in Kontakt treten können, wurden die CA-Oberflächen mit den Farbstoffen TMPyP, TPP, MB, TBO, MB-S2, MB-S3 und PN-Cl und die CA-Oberfläche ohne PS für zwei Stunden in *Aqua dest.* als Lösungsmittel gelegt. Anschließend wurden das *Aqua dest.* und die CA-Oberflächen spektroskopisch untersucht.

Makroskopisch konnten nach der Inkubation in *Aqua dest.* keine Veränderungen der CA-Oberflächen festgestellt werden. Die Absorptionsspektren der PS in den Kunststoffplatten wurden hinsichtlich einer Abnahme der Absorption vor und nach der Inkubation in *Aqua dest.* verglichen.

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wird exemplarisch die höchste Konzentration jeder CA-Oberflächen mit PS dargestellt.

Bei den Platten, die die lipophilen Farbstoffe TPP und MB-S3 enthalten, konnte im *Aqua dest.* kein charakteristisches Spektrum detektiert werden, welches auf das Vorhandensein von TPP- oder MB-S3-Molekülen hinweisen würde. Das heißt, dass sich keine PS-Partikel aus der CA-Oberfläche herausgelöst haben. Zudem konnte keine Abnahme der Absorptionsspektren der PS-Oberflächen nach der Inkubation in *Aqua dest.* gemessen werden (**Abb. 26 A und B**).

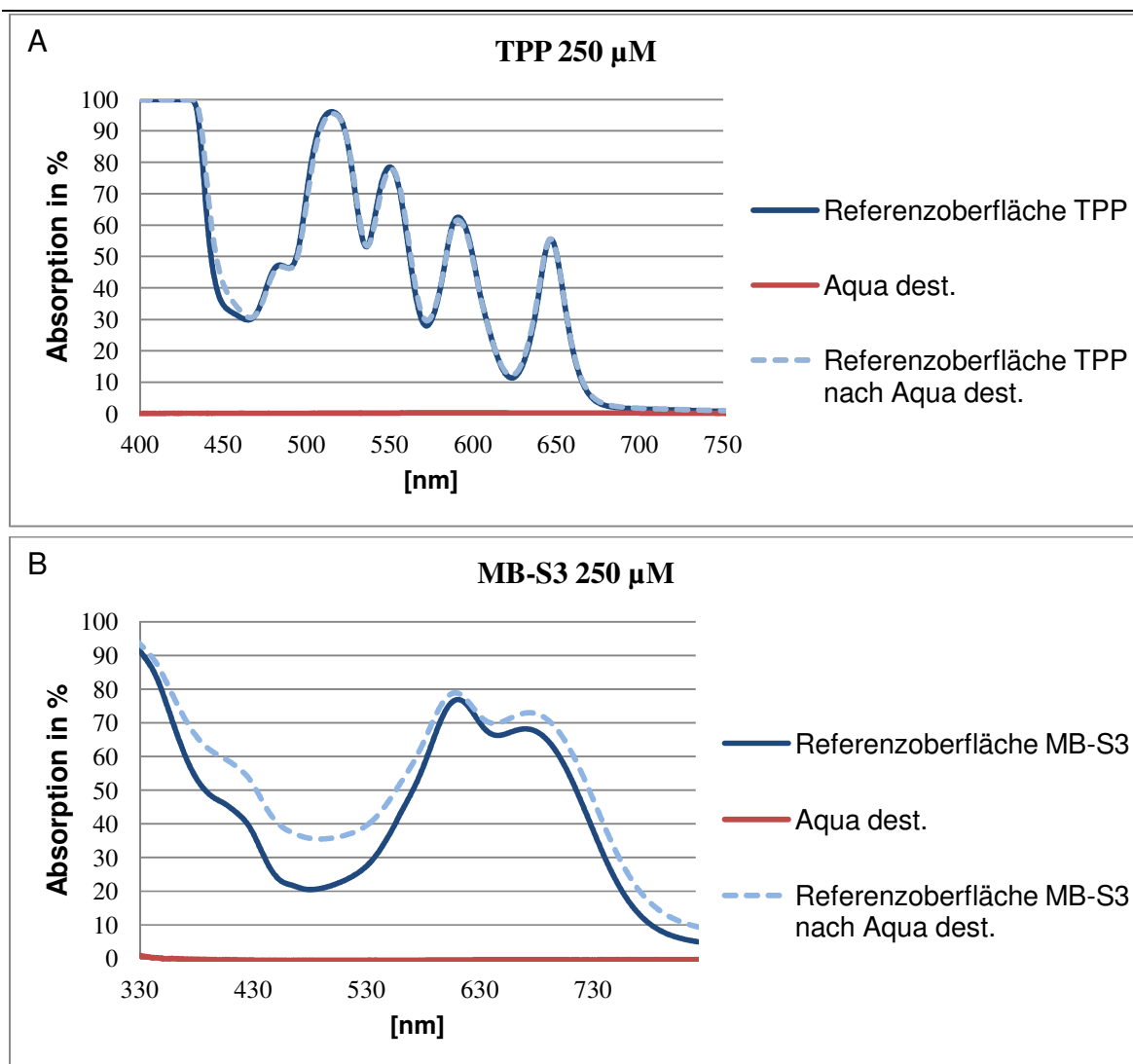


Abb. 26: Exemplarische Darstellung der Absorptionsspektren der CA-Oberflächen mit TPP (A) und MB-S3 (B) (je 250 μM) vor (durchgehende Linie) und nach (gestrichelte Linie) der Inkubation in *Aqua dest.* und des Lösungsmittels *Aqua dest.* selbst (rote Linie), in das die Kunststoffoberflächen für zwei Stunden gelegt wurden.

Bei der spektroskopischen Untersuchung der anderen CA-Oberflächen mit den PS PN-Cl, MB-S2, MB, TBO und TMPyP konnten im *Aqua dest.* für die jeweiligen PS typische Absorptionsspektren detektiert werden, die darauf hindeuten, dass sich Farbstoffmoleküle aus den CA-Oberflächen herausgelöst haben.

Die CA-Oberfläche mit PN-Cl (250 μM) zeigte einen PS-Verlust, wodurch eine Absorption im *Aqua dest.* von 2,4% bei 366 nm im Bereich des Absorptionsmaximums von PN-Cl (387 nm) detektiert werden konnte (**Abb. 27 B**). Allerdings konnte beim Vergleich der CA-Platten vor und nach der Inkubation in *Aqua dest.* keine Abnahme der Absorption des PN-Cl in der Oberfläche festgestellt werden (**Abb. 27 A**).

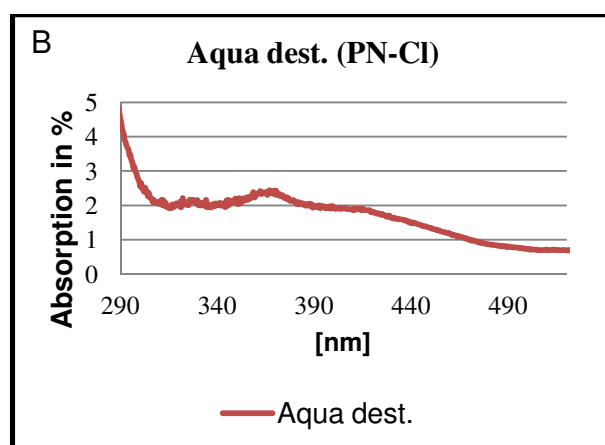
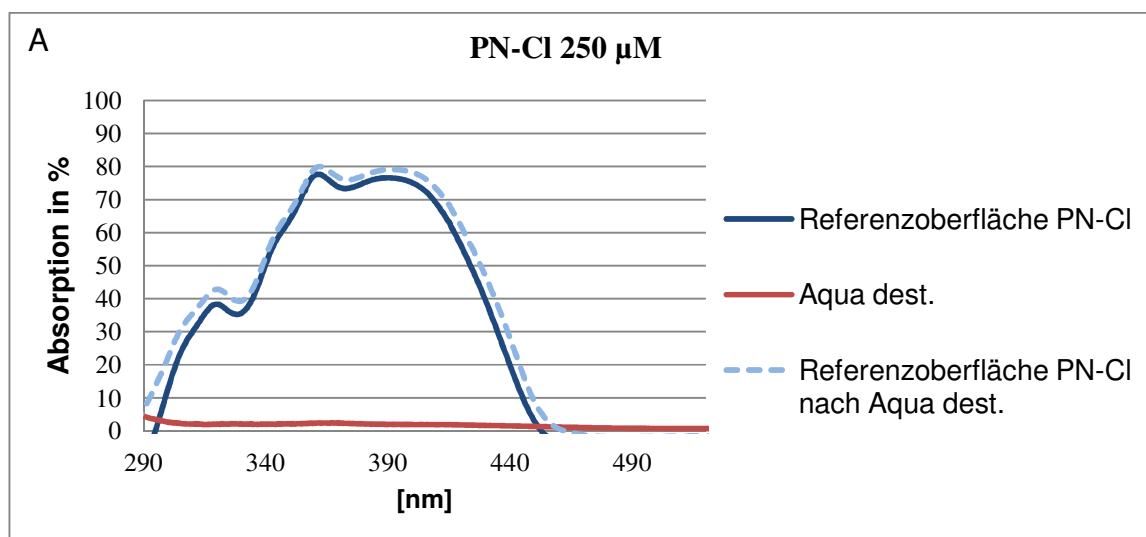


Abb. 27: Exemplarische Darstellung der Absorptionsspektren der CA-Oberfläche mit PN-Cl (250 μM) (A) vor (durchgehende Linie) und nach (gestrichelte Linie) der Inkubation in *Aqua dest.* und des Lösungsmittels *Aqua dest.* (B) selbst (rote Linie), in das die PN-Cl-Kunststoffoberfläche für zwei Stunden gelegt wurde.

Bei dem lipophilen Farbstoff MB-S2 (250 μM) konnten in der CA-Oberfläche zwei Absorptionsmaxima gemessen werden. Das Erste befindet sich bei 310 nm und das Zweite bei 664 nm. In *Aqua dest.* befinden sich beide Maxima mit 2% bei 340 nm und mit 0,3% bei 660,5 nm in den zwei Bereichen der Maximalabsorption des PS (**Abb. 28 B**). Eine Veränderung des Absorptionsspektrums von MB-S2 in der CA-Oberfläche wurde nicht festgestellt (**Abb. 28 A**).

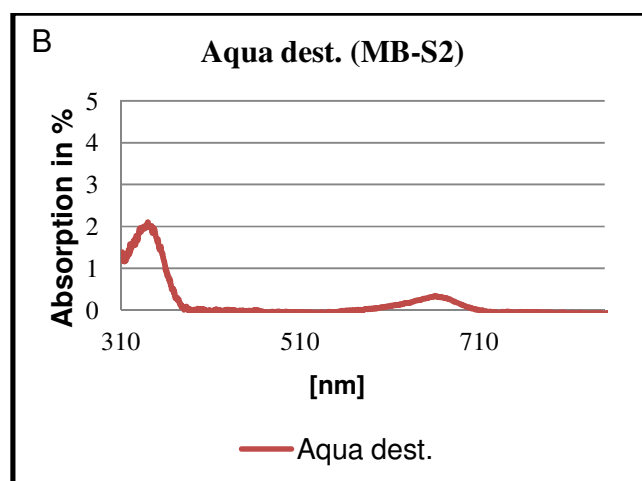
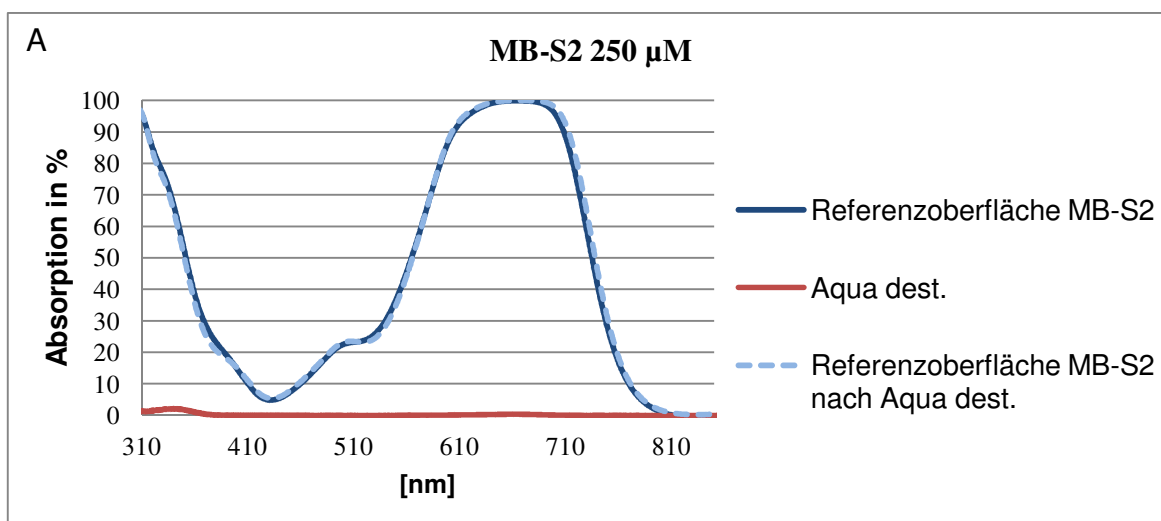


Abb. 28: Exemplarische Darstellung der Absorptionsspektren der CA-Oberfläche mit MB-S2 (250 μM) (A) vor (durchgehende Linie) und nach (gestrichelte Linie) der Inkubation in *Aqua dest.* und des Lösungsmittels *Aqua dest.* (B) selbst (rote Linie, vergrößert aus A), in das die MB-S2-Kunststoffoberfläche für zwei Stunden gelegt wurde.

Die Kunststoffoberfläche mit MB (50 μM) zeigte einen PS-Austritt, wodurch eine Absorption in dem Lösungsmittel *Aqua dest.* von 2,7% bei der Wellenlänge 664 nm im Bereich des Absorptionsmaximums von MB detektiert werden konnte (**Abb. 29 B**). Bei dem Vergleich der CA-Platten vor und nach der Inkubation in *Aqua dest.* konnte keine Abnahme der Absorption des MB in den Oberflächen festgestellt werden (**Abb. 29 A**).

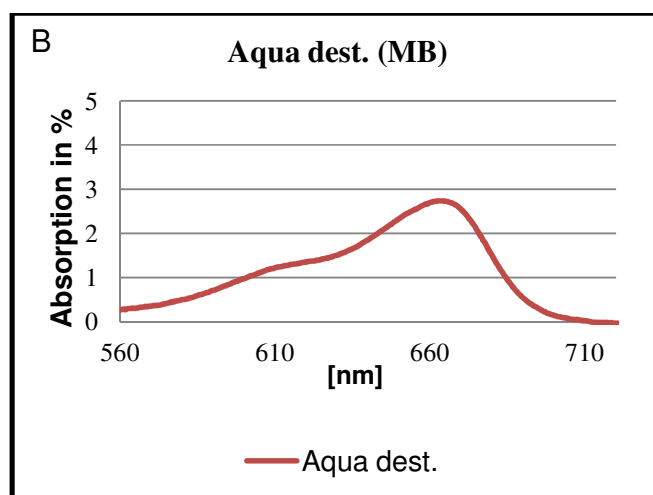
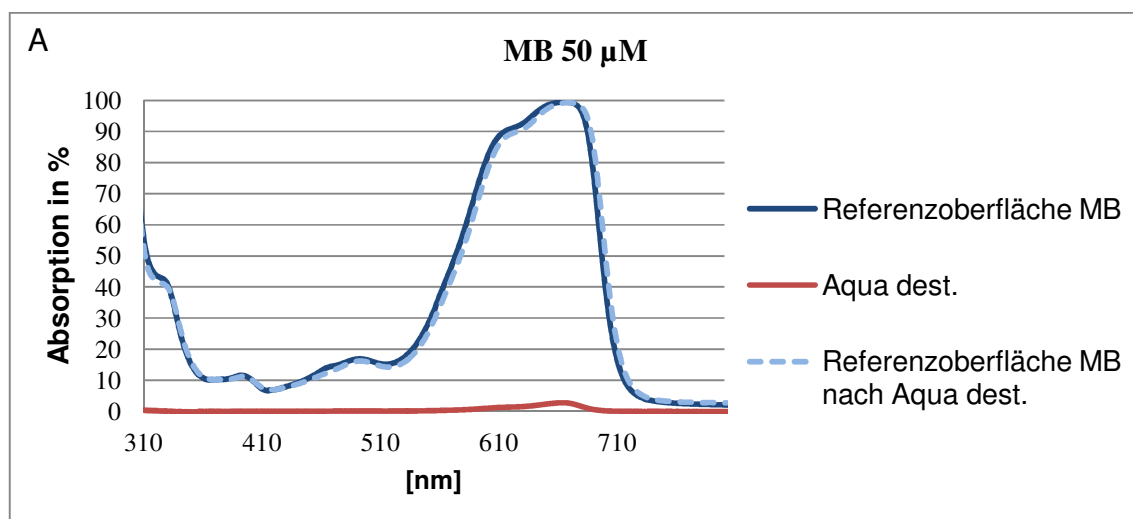
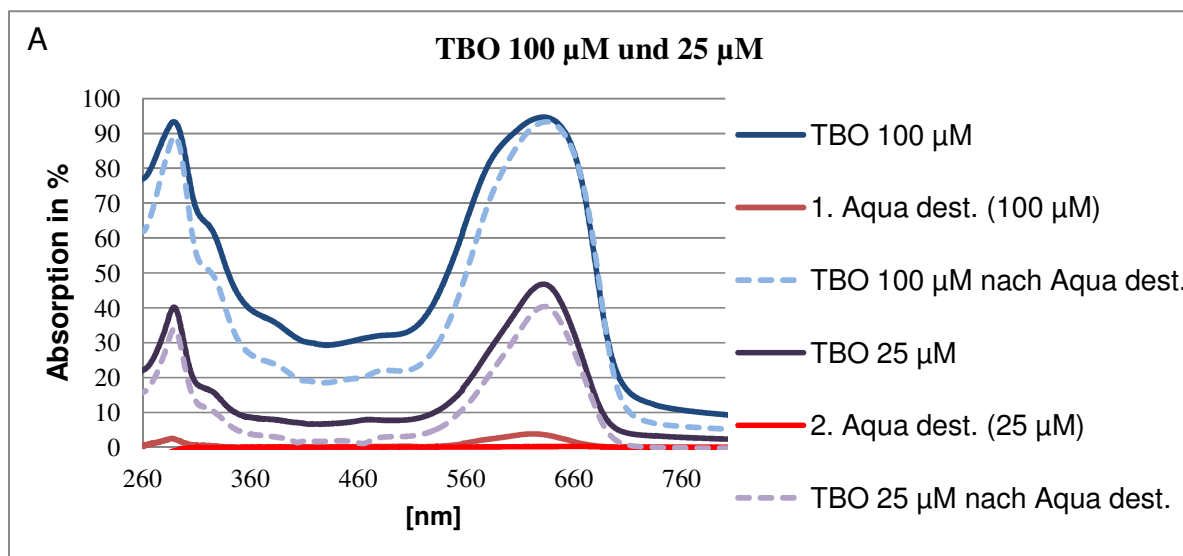


Abb. 29: Exemplarische Darstellung der Absorptionsspektren der CA-Oberfläche mit MB (50 μM) (A) vor (durchgehende Linie) und nach (gestrichelte Linie) der Inkubation in *Aqua dest.* und des Lösungsmittels *Aqua dest.* (B) selbst (rote Linie, vergrößert aus A), in das die MB-Kunststoffoberfläche für zwei Stunden gelegt wurde.

Bei dem hydrophilen Farbstoff TBO (100 μM , 25 μM) konnten nach zwei Stunden im *Aqua dest.* bei der Konzentration von 100 μM zwei Absorptionsmaxima und eines bei der Konzentration von 25 μM detektiert werden. Bei der CA-Oberfläche mit der TBO-Konzentration 100 μM befindet sich das erste Maximum bei 285,5 nm mit einer Absorption von 2,5% und das Zweite bei 624 nm mit einer Absorption von 3,8%. Beide Maxima befinden sich in den zwei Bereichen der Absorptionspeaks des PS (288,5 nm und 631 nm). Das Absorptionsmaximum der TBO-CA-Oberfläche mit der Konzentration 25 μM liegt im *Aqua dest.* bei 663 nm mit einer Absorption von 0,15% (**Abb. 30 B**).

Eine Abnahme der Absorption nach der Inkubation der TBO-Oberflächen in *Aqua dest.* konnte bei der Oberfläche mit 100 μM TBO im Bereich von 285 nm (erstes Absorptionsmaximum) um 5,3% und im Bereich von 630 nm (zweites Absorptionsmaximum) um 1,5% festgestellt werden. Bei der TBO-Oberfläche mit der Konzentration 25 μM konnte ebenfalls bei beiden Absorptionsmaxima eine Verringerung der Absorption detektiert werden. Im Bereich des ersten Absorptionsmaximums ein Rückgang der Absorption um 16% und im Bereich des Zweiten um 13,5% (**Abb. 30 A**).



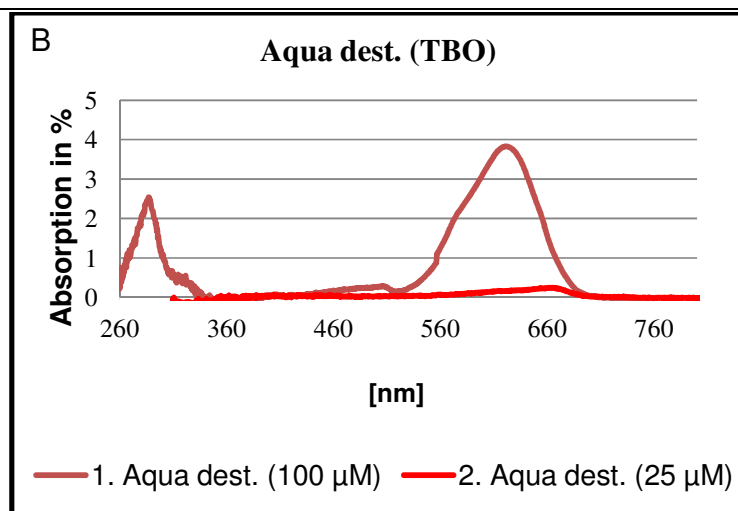
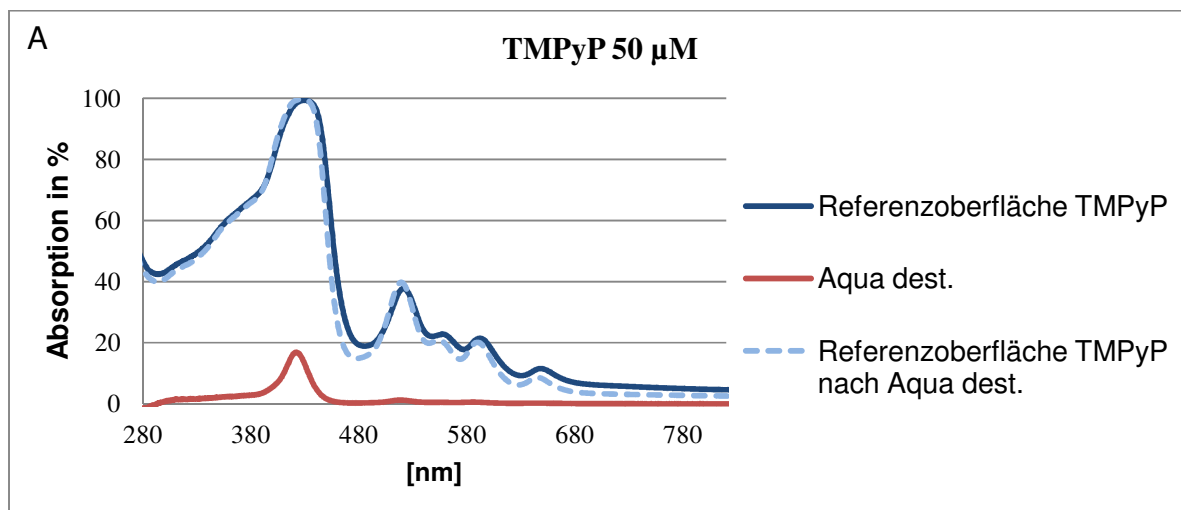


Abb. 30: Exemplarische Darstellung der Absorptionsspektren der CA-Oberflächen mit TBO (100 µM und 25 µM) (A) vor (durchgehende Linie) und nach (gestrichelte Linie) der Inkubation in *Aqua dest.* und des Lösungsmittels *Aqua dest.* (B) selbst (rote Linien, vergrößert aus A), in das die TBO-Kunststoffoberflächen für zwei Stunden gelegt wurden.

Die CA-Oberfläche mit TMPyP (50 µM) zeigte den größten PS-Verlust im *Aqua dest.* mit einer messbaren Absorption von 16,5% bei 423 nm (Soret-Bande) und einer von ca. 1% bei 520 nm im Bereich der ersten Q-Bande (**Abb. 31 B**). Bei dem Vergleich der CA-Oberflächen vor und nach der Inkubation in *Aqua dest.* konnte keine Abnahme der Absorption festgestellt werden (**Abb. 31 A**).



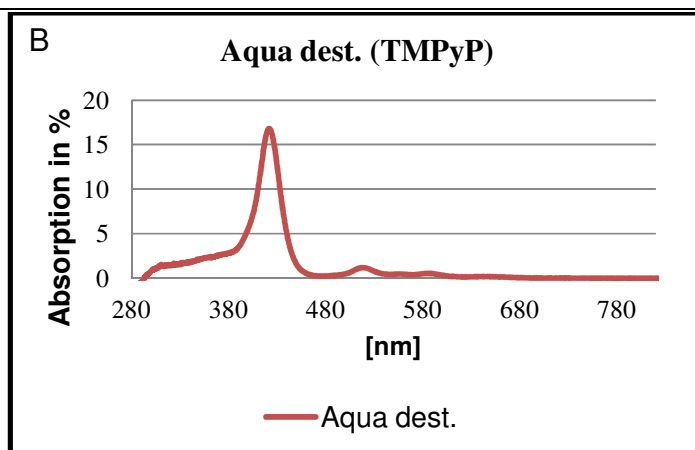


Abb. 31: Exemplarische Darstellung der Absorptionsspektren der CA-Oberflächen mit TMPyP (50 μM) (A) vor (durchgehende Linie) und nach (gestrichelte Linie) der Inkubation in *Aqua dest.* und des *Aqua dest.* (B) als Lösungsmittel (rote Linie, vergrößert aus A), in das die TMPyP-Kunststoffoberfläche für zwei Stunden gelegt wurde.

Bei allen hydrophilen PS TBO, MB und TMPyP wurden durch diese Methode im *Aqua dest.* typische Absorptionsspektren für diese PS detektiert, die darauf hinweisen, dass ein Herauslösen der Farbstoffpartikel aus der hydrophoben Polymermatrix stattgefunden hat. Die lipophilen PS zeigten hingegen weniger (PN-Cl und MB-S2) oder keinen (TPP, MB-S3) Verlust an PS-Molekülen aus der Polymermatrix im Lösungsmittel *Aqua dest.* (**Tabelle 10**).

			<i>Aqua dest.</i>
			maximale Absorption (in %)
Photosensibilisatoren	lipophil	TPP (250 μM)	0
		MB-S3 (250 μM)	0
		PN-Cl (250 μM)	2,4
		MBS2 (250 μM)	2
	hydrophil	MB (50 μM)	2,7
		TBO (100 μM)	3,8
		TBO (25 μM)	0,15
		TMPyP (50 μM)	16,5

Tabelle 10: Übersicht über die maximalen Absorptionen (in %) der PS-Moleküle im Lösungsmittel *Aqua dest.* herausgelöst aus den CA-Oberflächen

5.3.3 Langzeitbestrahlung der CA-Oberflächen ohne PS und mit TPP

Aufgrund des Verhaltens der verschiedenen PS in der CA-Polymermatrix wurde zur Langzeitbestrahlung einer selbstdesinfizierenden Oberfläche TPP verwendet, da dieser in dieser Art Oberflächenmatrix am stabilsten erscheint (siehe Kapitel 5.3.2) und TPP ausreichend zur Verfügung stand. Zur Feststellung, ob sich der PS TPP eingearbeitet in die CA-Matrix verändert, wurden die CA-Oberflächen ohne PS und mit den verschiedenen Konzentrationen von TPP (250 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 10 μM) nach 10-, 40- und 100-minütiger Bestrahlung mit der Lampe OmniCure® Series 2000 (λ_{em} 390 – 500 nm) mit einer Leistung von 50 mW/cm², was einer Gesamtenergie von 30 J/cm², 120 J/cm² und 300 J/cm² entspricht, spektroskopisch untersucht.

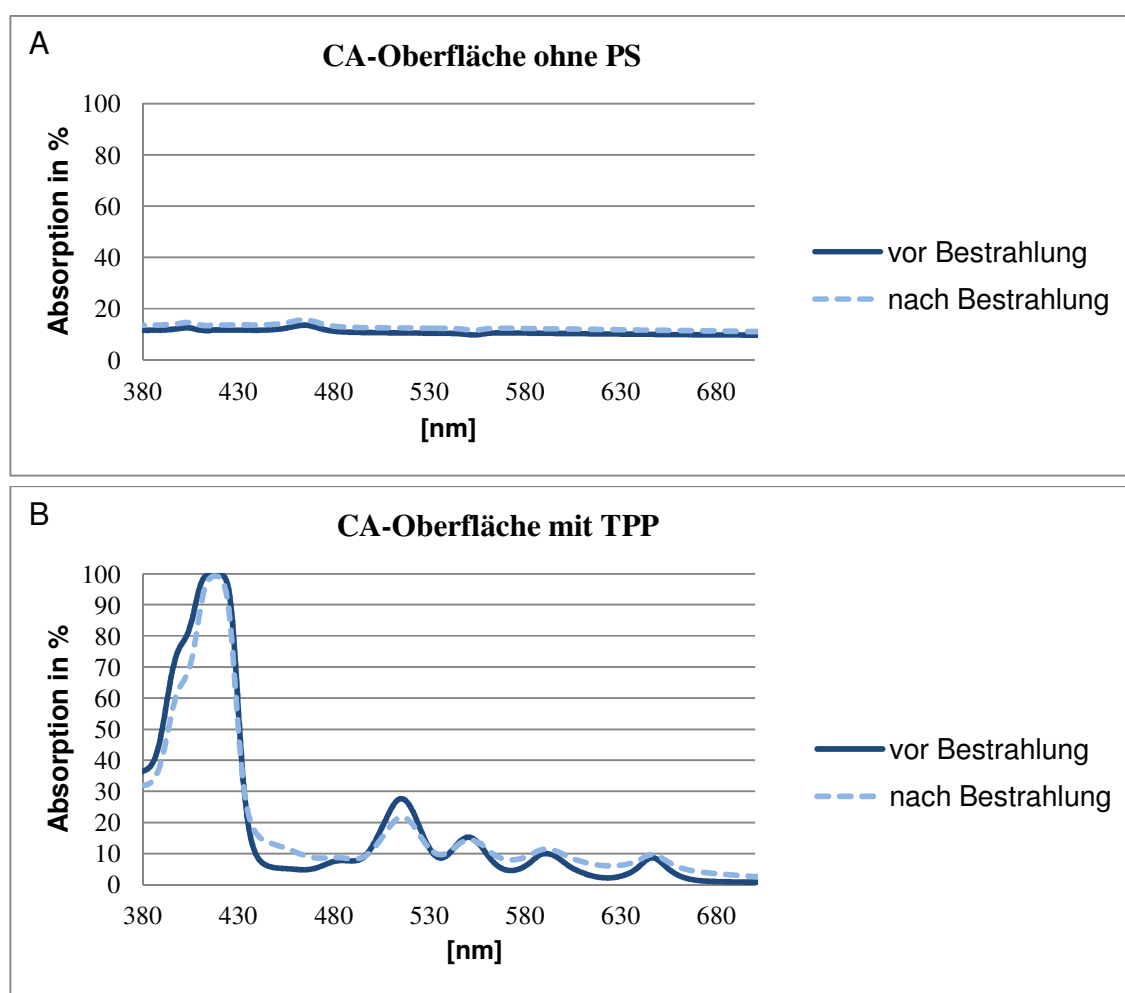


Abb. 32: Darstellung der Absorptionsspektren der CA-Oberfläche ohne PS (A) und mit TPP (10 μM) (B) vor (durchgängige Linie) und nach (gestrichelte Linie) der Bestrahlung mit 300 J/cm².

Rückgang der Absorption der ersten Q-Bande				
		applizierte Energie pro cm ²		
		30 J	120 J	300 J
Konzentration	250 µM	-0,70%	-1,20%	-2,20%
	100 µM	-2,40%	-3,40%	-12%
	50 µM	0%	-3%	-10,70%
	25 µM	-7,15%	-8,20%	-17,60%
	10 µM	-1,65%	-6,20%	-21,40%

Tabelle 11: Übersicht über die Bestrahlung der TPP-CA-Oberflächen mit verschiedenen Konzentrationen: dargestellt ist der prozentuale Rückgang der Absorption der ersten Q-Bande bei 515 nm bei den Bestrahlungsenergien 30 J/cm², 120 J/cm² und 300 J/cm² (Berechnung basierend auf den Absorptionsspektren der unbestrahlten TPP-CA-Oberflächen unter Verwendung der entsprechenden Konzentrationen als Referenz)

Das Absorptionsspektrum der CA-Oberfläche ohne PS veränderte sich während der Bestrahlung nicht (**Abb. 32 A**).

Die CA-Oberfläche mit TPP zeigte im Bereich der Q-Banden ein Ausbleichen in Form einer leichten Verringerung der Absorptionen nach jeder Bestrahlung (**Tabelle 11**). Die Soret-Bande (417 nm), die mit dem Emissionsspektrum der Lampe OmniCure® Series 2000 (λ_{em} 390 - 500 nm) überlappt, blieb jedoch relativ stabil und ihr Absorptionsmaximum verringerte sich um maximal 0,9% bei der Konzentration 10 µM nach der Bestrahlung mit 300 J/cm² (**Abb. 32 B**).

Der Bereich der maximalen Absorption der Soret-Bande verschmälerte sich allerdings, was darauf schließen lässt, dass auch in diesem Bereich Farbstoffmoleküle zerstört werden und nach einer längeren Bestrahlungszeit weniger Absorption stattfindet. Eine genaue Bestimmung des Absorptionsverlusts war mit der verwendeten Methode nicht möglich.

Da für jeden Phototoxizitätstest neue CA-Oberflächen verwendet wurden, kann davon ausgegangen werden, dass gleichbleibende Bedingungen während eines Bestrahlungsintervalls herrschten.

5.4 Ergebnisse der Singulett-Sauerstoff-Messungen der CA-Oberflächen

In Zusammenarbeit mit Dr. rer. physiol. A. Felgenträger aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Bäuml (Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg) wurde ein spektroskopisches Nachweisverfahren eingesetzt, welches Singulett-Sauerstoff direkt zeit- und spektralaufgelöst (bei 1270 nm) über die Messung seiner Lumineszenz detektiert. Mit dieser Methode konnte bereits die photodynamische Erzeugung von Singulett-Sauerstoff in wässriger Lösung, in Lipidsuspensionen und in eukaryonten bzw. prokaryonten Zellsuspensionen unter Verwendung von geeigneten Photosensibilisatoren detektiert werden [126, 127]. Dieses Verfahren wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit erstmals bei CA-Oberflächen zur Bestimmung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz eingesetzt (**Abb. 33**).

Ermittelt wurden die Anstiegs- und Abklingzeiten der zeitaufgelösten Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignale, die man durch Bestrahlung der CA-Oberflächen mit den PS MB, TMPyP und TPP erhielt (**Tabelle 12**).

	t_1 [μ s]	t_2 [μ s]
MB	42.6	13.6
TMPyP	56.9	13.9
TPP	37.6	12

Tabelle 12: Darstellung der Anstiegs- (t_1) und Abklingzeit (t_2) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz jedes PS (je 25 μ M) in den CA-Oberflächen (geschätzter Fehler 10%);

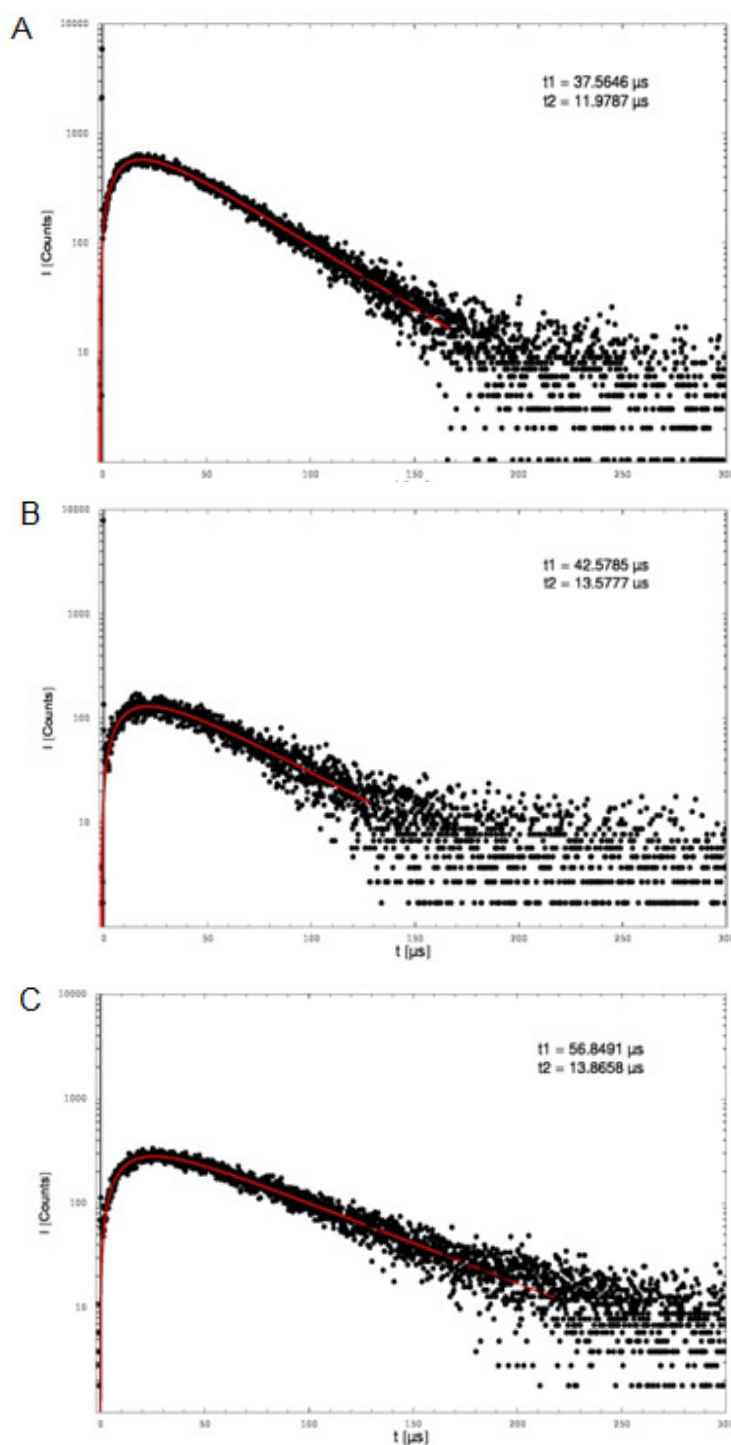


Abb. 33: Exemplarische Darstellungen des Lumineszenzsignals von Singulett-Sauerstoff in der CA-Oberfläche für TPP (A), MB (B) und TMPyP (C) (je 25 μ M) an Luft und Anregung durch Laserimpulse (50 mW): Ermittlung der Anstiegs- und Abklingzeit (t_1 und t_2)

Die zeitaufgelösten Signale ließen sich aufgrund ihrer hohen Intensität sehr gut auswerten. Die Anstiegs- und Abklingzeiten lagen im μs -Bereich, wobei die Abklingzeit t_2 für alle drei PS mit $13,1 \pm 1,3 \mu\text{s}$ im Rahmen der Fehlertoleranz von 10% lag. Aus diesem Grund wurde t_2 der Deaktivierungszeit τ_Δ des Singulett-Sauerstoff zugeordnet und t_1 der Deaktivierungszeit τ_{T_1} für den angeregten T_1 -Zustand des jeweiligen PS.

Zum eindeutigen Nachweis von Singulett-Sauerstoff wurde zudem ein Emissionsspektrum der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz am Beispiel einer TMPyP-CA-Oberfläche mit Hilfe von Interferenzfiltern erstellt, mit denen bei unterschiedlichen Wellenlängen jeweils die emittierten Photonen detektiert werden (**Abb. 34**).

Durch Fluoreszenz und insbesondere durch Phosphoreszenz des PS könnten die Lumineszenzsignale von Singulett-Sauerstoff bei 1270 nm überlagert werden, was durch die spektralaufgelöste Messung ausgeschlossen werden kann.

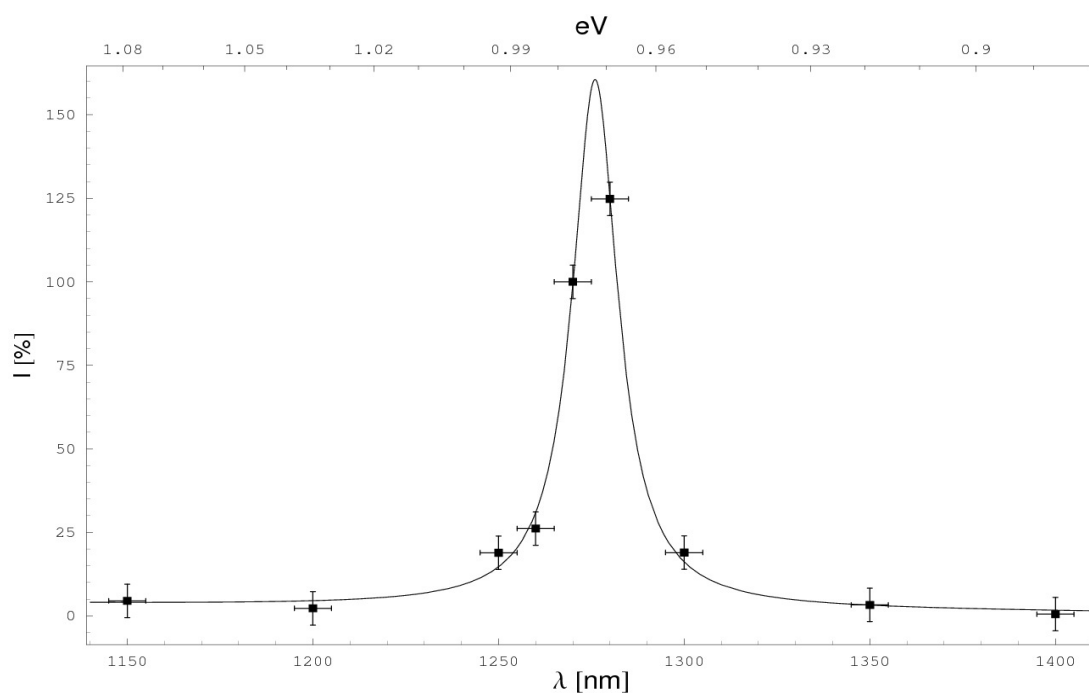


Abb. 34: Spektralaufgelöstes Singulett-Sauerstoff-Signal (Wellenlängenbereich 1150 – 1400 nm) generiert in der CA-Oberfläche mit TMPyP (25 μM) als beispielhafter Photosensibilisator.

Die aufgetragenen Messwerte zeigen das integrierte Lumineszenzsignal pro Wellenlänge der verwendeten Interferenzfilter und sind auf den maximalen Wert normiert. Ein Lorenz-Kurvenfit mit einem Maximum zwischen $\lambda_{\max} = 1270 - 1280$ nm wurde an die Messwerte angepasst (**Abb. 34**).

Das Emissionsmaximum für Singulett-Sauerstoff generiert in CA wurde bei 1275 ± 2 nm detektiert. Somit kann eine Überlagerung durch Emission verursacht durch Phosphoreszenz des PS oder andere strahlungsbehaftete Prozesse ausgeschlossen werden. Zusammen mit dem zeitaufgelösten Signal ist dies ein eindeutiger Nachweis für das Vorhandensein von Singulett-Sauerstoff.

5.5 Ergebnisse der biologischen Versuche mit den CA-Oberflächen

5.5.1 Bestimmung der Wiederfindungsrate von *S. aureus*

Um zu bestimmen, wie viele Bakterien durch die manuelle Abtragung von den CA-Oberflächen aufgenommen werden konnten und um einen systematischen Fehler abschätzen zu können, wurden Versuche zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der Bakterien durchgeführt.

Die Effizienz der Methode wurde auf verschiedenen Kunststoffplatten ohne PS, mit TPP und mit TBO hinsichtlich ihrer Genauigkeit und Reproduzierbarkeit überprüft. Zur Kontrolle der Bakteriengesamtmenge wurden 50 μ l der Bakteriensuspension in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml Müller-Hinten-Boullion pipettiert, was 100% der aufgetragenen Bakterienmenge entsprechen sollte.

Durch die Methode zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der Bakterien war ein Verlust an Bakterien von weniger als 1 \log_{10} -Stufe ohne Unterschied zwischen den eingearbeiteten PS zu erzielen. Bei den CA-Oberflächen ohne PS war der Bakterienverlust ca. 38%, bei denen mit TPP ca. 12% und bei denen mit TBO ca. 44% (**Abb. 35**). Daraus lässt sich folgern, dass diese Methode zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von *S. aureus* für die folgenden Phototoxizitätstests geeignet ist.

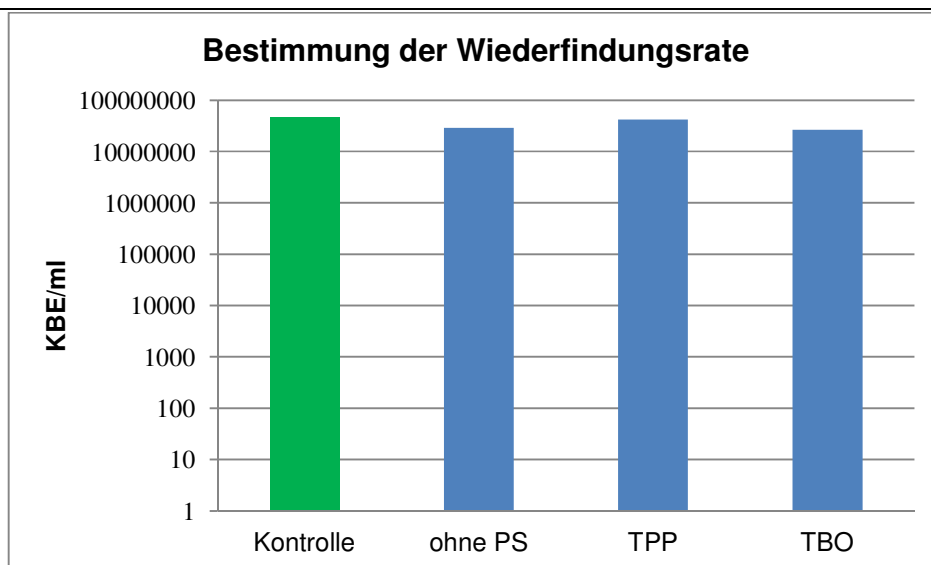


Abb. 35: Exemplarische Darstellung der Ergebnisse der Methode zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der Bakterien; grüner Balken: Kontrolle: Ausgangsbakterienmenge in Suspension als Referenzpunkt (\triangleq 100%), blaue Balken: Anzahl der KBE/ml nach Abtragung von den CA-Oberflächen

5.5.2 Phototoxizitätsversuche mit den CA-Oberflächen und *S. aureus*

Für die Phototoxizitätsversuche wurden die CA-Oberflächen mit den lipophilen Farbstoffen TPP, MB-S2, MB-S3 und PN-Cl und dem hydrophilen PS TBO verwendet. Für jeden Versuch wurden neuhergestellte Kunststoffplatten verwendet. Als Kontrollen wurden für alle Bedingungen eine Dunkelkontrolle für die CA-Platten ohne und mit PS und eine Bestrahlung der CA-Oberfläche ohne PS durchgeführt. Die Vorbereitung der CA-Oberfläche ohne und mit PS wurde wie in der Methode zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der Bakterien durchgeführt.

TPP-CA-Oberflächen

Mit den CA-Oberflächen, die TPP (250 μ M, 100 μ M, 10 μ M) enthielten, wurden Phototoxizitätsversuche unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Die verwendete Lampe zur Bestrahlung war OmniCure[®] Series 2000 (λ_{em} 390 - 500 nm). Bei längeren Bestrahlungszeiten ab 30 Minuten wurde durch Licht allein auf den CA-Oberflächen ohne PS eine Inaktivierung der Bakterien festgestellt.

Parallel zu der Bestrahlung wurde die Temperatur (Infrarotthermometer 65) auf der TPP-Oberfläche bestimmt. Dabei konnte ein Temperaturanstieg von maximal 2,5 °C (von 20,5 °C auf 23 °C) nach 30 Minuten gemessen werden.

Bei einer Bestrahlung von 30 Minuten mit einer Bestrahlungsintensität von 50 mW/cm^2 und einer daraus resultierenden Gesamtenergie von 90 J/cm^2 kam es zu einer Inaktivierung der Bakterien auf den CA-Oberflächen ohne PS um mehr als 99,99%, was einer Reduktion der überlebenden Bakterien von 4 \log_{10} -Stufen entspricht (**Abb. 36**).

Bei allen Phototoxizitätsversuchen und längeren Bestrahlungszeiten durchgeführt mit der Lampe OmniCure®Series 2000 (λ_{em} 390 - 500 nm) und dementsprechend höheren Bestrahlungsenergien (60 J/cm^2) wurde ebenfalls eine Lichttoxizität nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

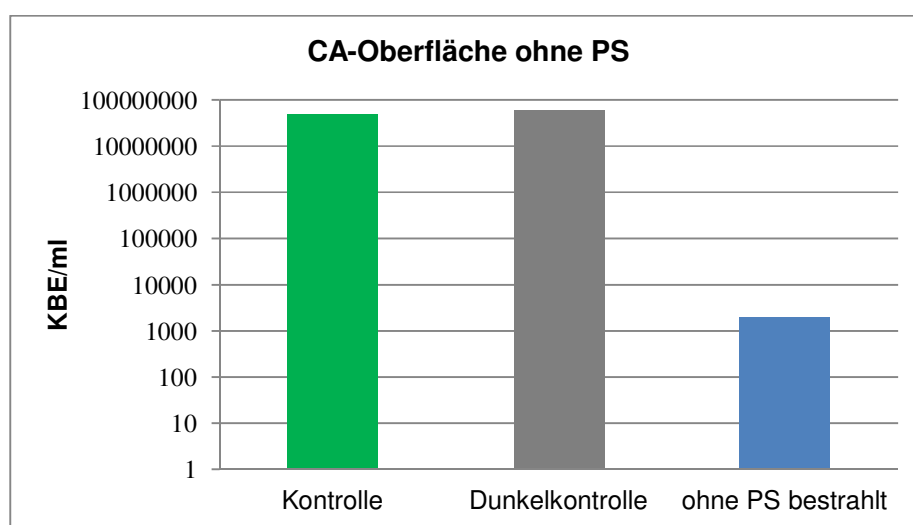


Abb. 36: Exemplarische Darstellung der Inaktivierung der Bakterien durch die Bestrahlung allein; Lampe OmniCure®Series 2000; grüner Balken: Kontrolle: Ausgangsbakterienmenge in Suspension als Referenzpunkt ($\triangleq 100\%$), blauer Balken: bestrahlte Bakterien auf CA-Oberfläche ohne PS (90 J/cm^2), grauer Balken: Dunkelkontrolle, das heißt Bakterien ohne Bestrahlung.

Die Applikation von 30 J/cm^2 führte bei der TPP-Konzentration von $250 \mu\text{M}$ in den CA-Oberflächen zu einer Reduktion der Bakterien um annähernd 2 \log_{10} -Stufen (98,9%) und bei einer TPP-Konzentration von $100 \mu\text{M}$ um 1 \log_{10} -Stufe (93,7%) (**Abb. 37 B**).

Im Vergleich dazu war die Reduktion bei der Applikation von 18 J/cm^2 geringer und lag bei der TPP-Konzentration von $250 \mu\text{M}$ bei weniger als 1 \log_{10} -Stufe (73%) (**Abb. 37 A**).

Bei den bestrahlten CA-Oberflächen ohne PS war ebenfalls eine Reduktion der Bakterien festzustellen. Bei 30 J/cm^2 betrug die Reduktion der Bakterien auf den CA-Oberflächen ohne PS 67,4% und bei 18 J/cm^2 31%. Durch den photodynamischen Effekt wurde somit eine zusätzliche Toxizität von ca. 30% erzielt.

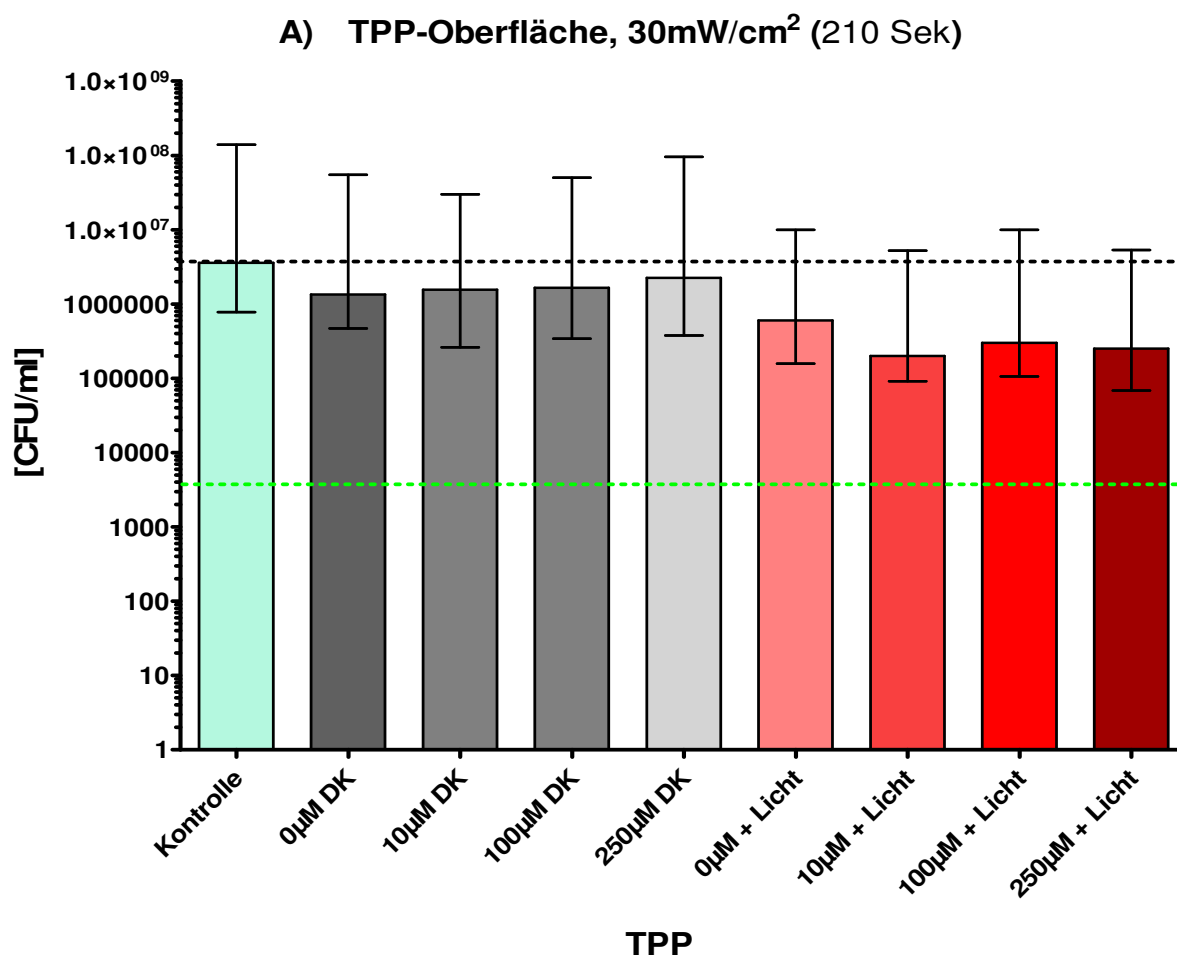


Abb. 37 A: Ergebnisse der Phototoxizitätstests der TPP-CA-Oberflächen (250 µM, 100 µM, 10 µM) gegenüber *S. aureus*. Bestrahlung der Proben mit 18 J/cm^2 ; Lampe OmniCure®Series 2000. Genauere Beschreibung siehe **Abb. 37 B**.

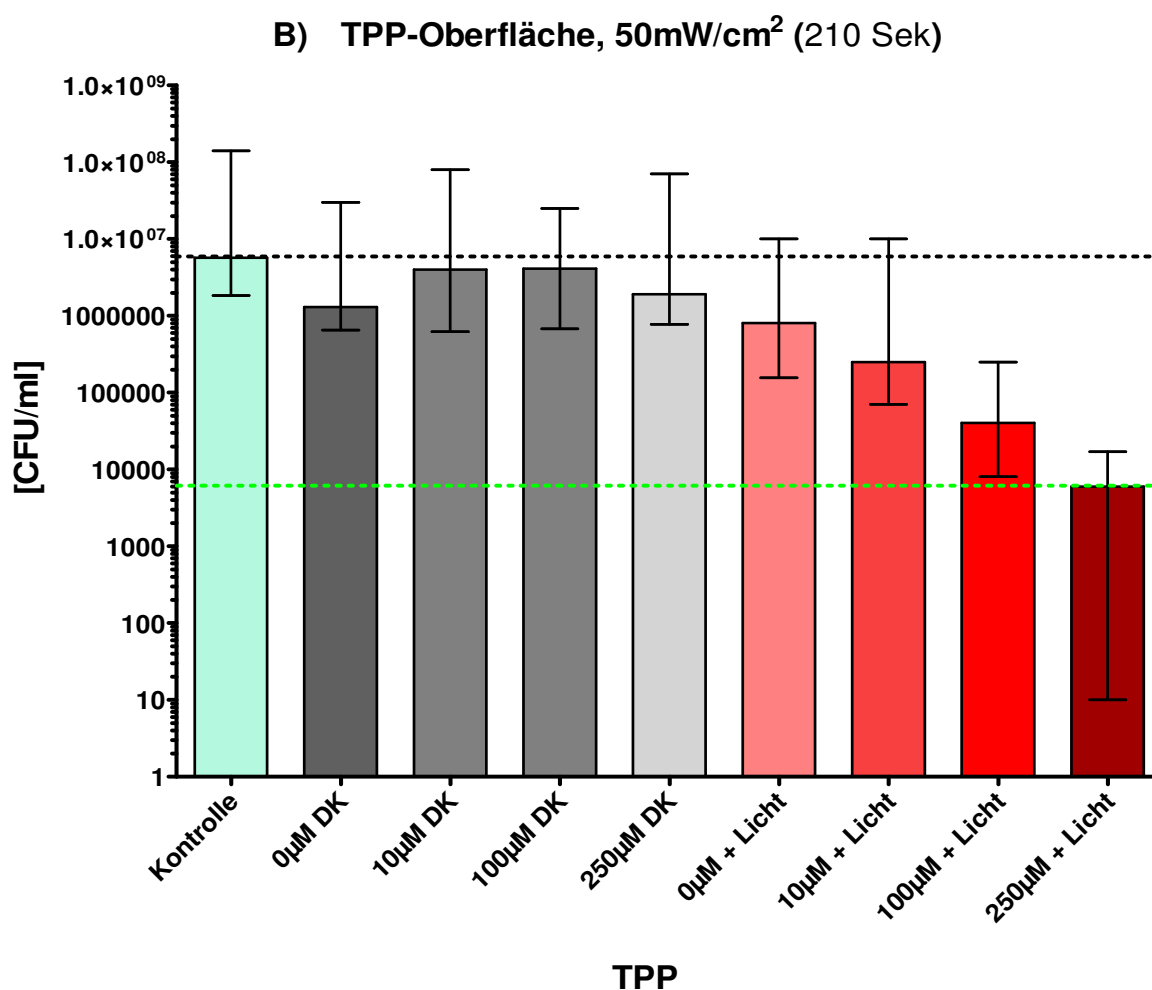


Abb. 37 B: Ergebnisse der Phototoxizitätstests der TPP-CA-Oberflächen (250 µM, 100 µM, 10 µM) gegenüber *S. aureus*. Bestrahlung der Proben mit 30 J/cm²; Lampe OmniCure®Series 2000. Hellblauer Balken: Bakterienkontrolle: Ausgangsbakterienmenge in Suspension als Referenzpunkt (\triangleq 100%), graue Balken: Dunkelkontrolle: Bakterien ohne und mit TPP ohne Bestrahlung, rote Balken: bestrahlte Bakterien ohne und mit TPP; die Balken repräsentieren den Median von drei unabhängigen Experimenten, der die 25% und 75% Quartile enthält. Werte unter der horizontalen grünen Linie entsprechen einer Reduktion der Bakterien um $\geq 99,9\%$ (3 log₁₀-Stufen).

Bei einer Bestrahlungsdauer von 10 Minuten wurde unter verschiedenen Bedingungen eine photodynamisch induzierte Toxizität durch die TPP-CA-Oberfläche gegenüber *S. aureus* erzielt (**Tabelle 13**).

		CA-Oberfläche mit TPP		
		Leistung/cm ²		
		50 mW	30 mW	10 mW
Konzentration	250 µM	++	-	-
	100 µM	+	-	-
	10 µM	-	-	-
Energie/cm ²		30 J	18 J	6 J
Bestrahlungsdauer		10 Min		

+: 1 log₁₀-Stufe Reduktion, ++: 2 log₁₀-Stufen Reduktion, -: keine Inaktivierung

Tabelle 13: Übersicht über die Ergebnisse der Phototoxizitätstests mit den TPP-Oberflächen (250 µM, 100 µM, 10 µM) und *S. aureus*; Lampe OmniCure®Series 2000.

Eine Reduktion der Bakterien auf der CA-Oberfläche ohne PS wurde ebenfalls bei der fraktionierten Bestrahlung der TPP-Oberflächen (250 µM, 100 µM, 10 µM) für fünfmal 10 Minuten mit 10 mW/cm² und einer resultierten Gesamtenergie von 30 J/cm² festgestellt (**Abb. 38**).

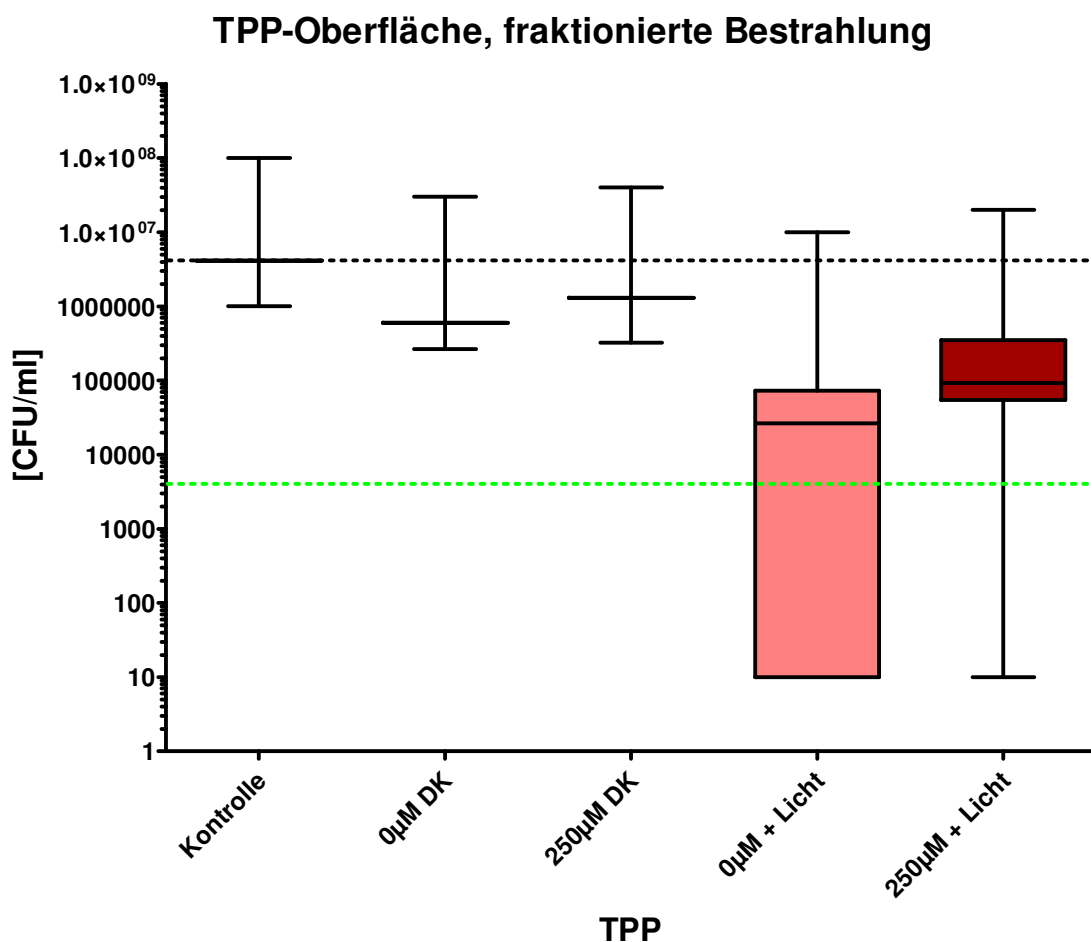


Abb. 38: Fraktionierte Bestrahlung der TPP-CA-Oberflächen als Box and Whisker-Darstellung; Lampe OmniCure®Series 2000. Kontrolle: Ausgangsbakterienmenge in Suspension als Referenzpunkt (\triangleq 100%), Dunkelkontrolle: Bakterien ohne und mit TPP ohne Bestrahlung, rote Balken: bestrahlte Bakterien ohne und mit TPP; der schwarze Querbalken repräsentiert den Median. Die Box enthält den Bereich der 25% und 75% Quartile. Werte unter der horizontalen grünen Linie entsprechen einer Reduktion der Bakterien um $\geq 99,9\%$ (3 \log_{10} -Stufen).

Nach der Auszählung der KBE/ml konnte festgestellt werden, dass *S. aureus* allein durch die Bestrahlung mit der Lampe OmniCure®Series 2000 (λ_{em} 390 - 500 nm) auf der CA-Oberfläche ohne PS reduziert wurde und es konnte kein zusätzlicher phototoxischer Effekt auf die Bakterien durch TPP in den Oberflächen gezeigt werden (**Abb. 38**).

MB-S2-, MB-S3- und PN-Cl-CA-Oberflächen:

Zusätzlich wurden mit den CA-Oberflächen, die MB-S2, MB-S3 und PN-Cl (je 250 µM, 100 µM, 10 µM) enthielten, Phototoxizitätstests unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Die zur Bestrahlung verwendeten Lampen waren die Lampe Teclas Source, Filter 2 (λ_{em} 550 – 750 nm) für die Farbstoffe MB-S2 und MB-S3 und die Lampe UV 236 Waldmann Medizintechnik (λ_{em} 380 - 480 nm) für den Farbstoff PN-Cl.

Phototoxizitätstests mit <i>S. aureus</i>						
		CA-Oberflächen mit				
		MB-S2			PN-Cl	
Intensität pro cm ² :		50 mW			15 mW	6 mW
Konzentration	250 µM	-	-	-	-	-
	100 µM	-	-	+	-	-
	10 µM	-	-	-	-	-
Bestrahlungszeit		10 Min	20 Min	30 Min	33,3 Min	83,3 Min
Energie pro cm ²		30 J	60 J	90 J	30 J	

+: 1 log₁₀-Stufe Reduktion, -: keine Inaktivierung

Tabelle 14: Übersicht über die Ergebnisse der Phototoxizitätstests mit den CA-Oberflächen MB-S2 und PN-Cl (je 250 µM, 100 µM, 10 µM)

Bei der Bestrahlung der MB-S2-CA-Oberflächen konnte bei der Applikation von 30 J/cm² und 60 J/cm² kein Phototoxizitätseffekt erzielt werden (**Tabelle 14**).

Bei einer applizierten Gesamtenergie von 90 J/cm^2 konnte eine Inaktivierung der Bakterien auf der MB-S2-CA-Oberfläche ($100 \mu\text{M}$) um 94% (1 \log_{10} -Stufe) erreicht werden. Die Bestrahlung mit der Lampe Teclas Source, Filter 2 (λ_{em} 550 – 750 nm) alleine zeigte keine lichttoxische Wirkung auf die Bakterien (**Abb. 39**).

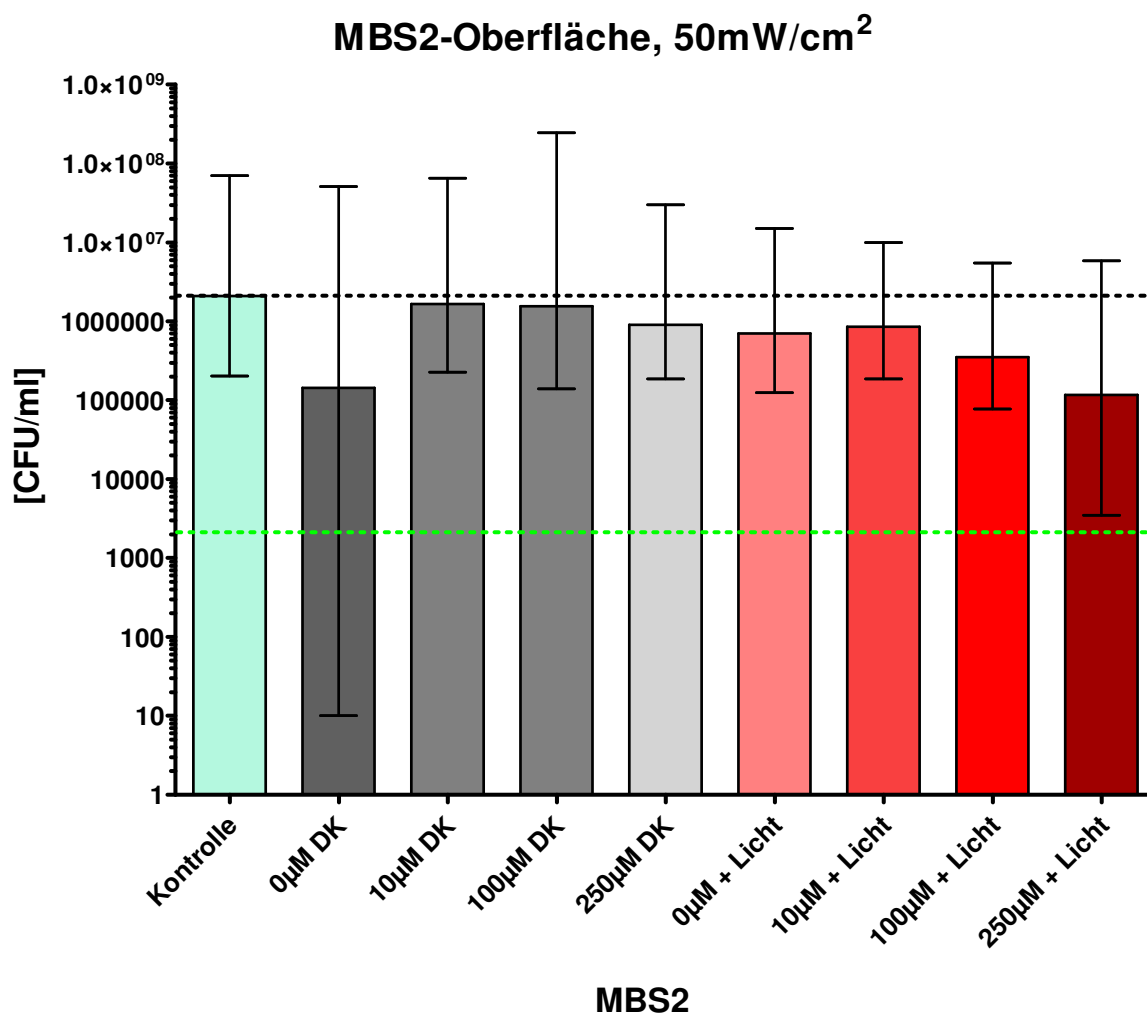


Abb. 39: Exemplarische Darstellung der Ergebnisse der Phototoxizitätstests der MB-S2-CA-Oberflächen ($250 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$) gegenüber *S. aureus*; Lampe Teclas Source, Filter 2; 50 mW/cm^2 für 30 Minuten. Hellblauer Balken: Kontrolle: Ausgangsbakterienmenge in Suspension als Referenzpunkt ($\triangleq 100\%$), graue Balken: Dunkelkontrolle: Bakterien ohne und mit MB-S2 ohne Bestrahlung, rote Balken: bestrahlte Bakterien ohne und mit MB-S2; die Balken repräsentieren den Median, der die 25% und 75% Quartile enthält. Werte unter der horizontalen grünen Linie entsprechen einer Reduktion der Bakterien um $\geq 99,9\%$ (3 \log_{10} -Stufen).

Die Bestrahlung mit der Lampe UV 236 Waldmann Medizintechnik (λ_{em} 380 - 480 nm) zeigte einen Toxizitätseffekt allein durch Licht auf die Bakterienproben auf den CA-Oberflächen ohne eingearbeitete PS von 99,2% (2 \log_{10} -Stufen) (**Abb. 40**). Somit konnte keine Aussage über die Phototoxizität von PN-Cl eingearbeitet in die CA-Oberfläche getroffen werden und es erfolgten keine weiteren Versuche mit den PN-Cl-CA-Oberflächen.

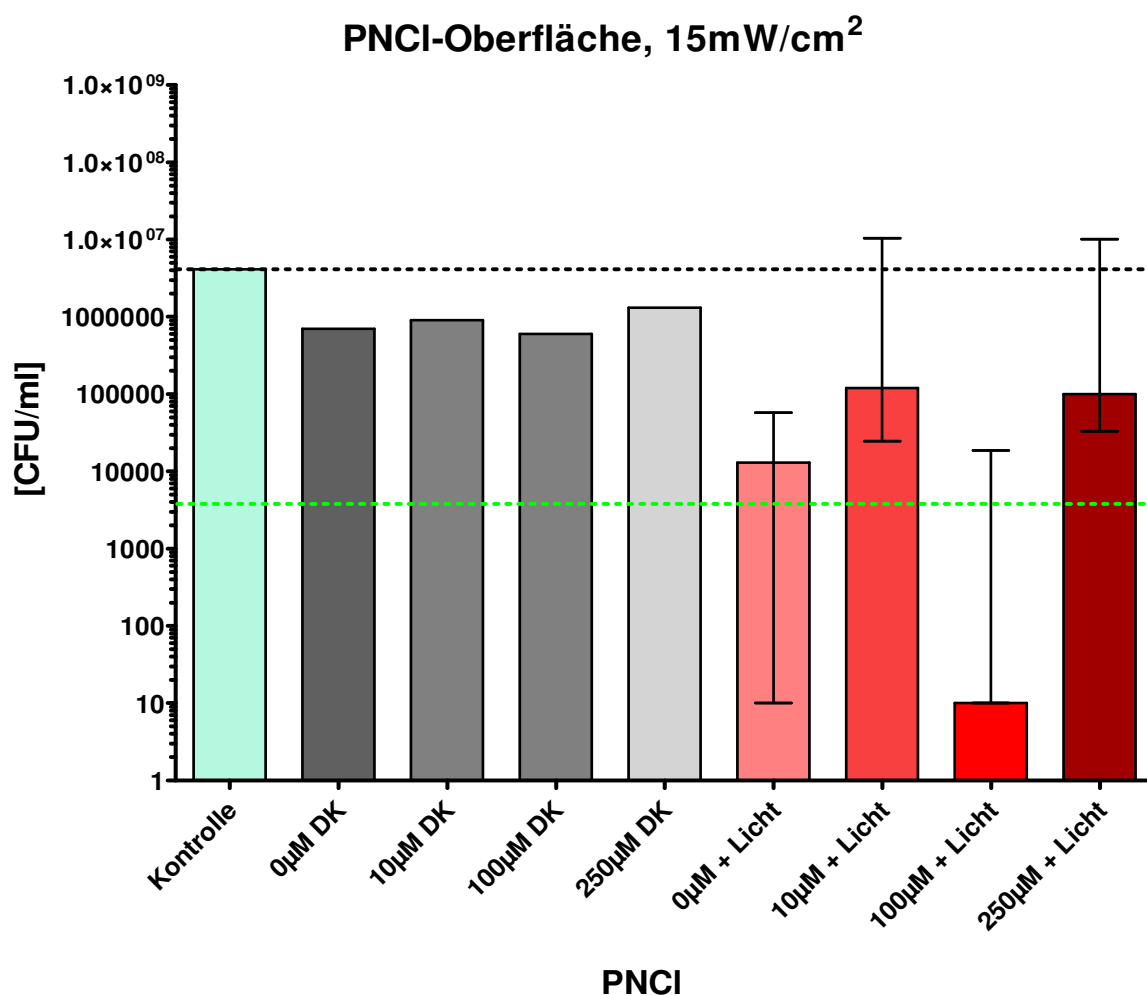


Abb. 40: Exemplarische Darstellung der Ergebnisse der Phototoxizitätstests der PN-Cl-CA-Oberflächen (250 µM, 100 µM, 10 µM) gegenüber *S. aureus*; Lampe UV 236 Waldmann Medizintechnik, 6 mW/cm² für 83,3 Minuten (30 J/cm²). Hellblauer Balken: Kontrolle: Ausgangsbakterienmenge in Suspension als Referenzpunkt (\triangleq 100%), graue Balken: Dunkelkontrolle: Bakterien ohne und mit PN-Cl ohne Bestrahlung rote Balken: bestrahlte Bakterien ohne und mit PN-Cl; die Balken repräsentieren den Median, der die 25% und 75% Quartile enthält. Werte unter der horizontalen grünen Linie entsprechen einer Reduktion der Bakterien um $\geq 99,9\%$ (3 \log_{10} -Stufen).

Die CA-Oberflächen mit dem eingearbeiteten PS MB-S3 eigneten sich für die Phototoxizitätstests nicht. Es konnten mit der Methode zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von *S. aureus* weder auf den unbestrahlten noch auf den bestrahlten CA-Oberflächen Bakterien kultiviert werden (Daten nicht gezeigt).

TBO-CA-Oberflächen:

Die effektivste Inaktivierung von *S. aureus* durch TPP war bei einer Bestrahlungsintensität mit 50 mW/cm^2 für 10 Minuten (30 J/cm^2) zu erreichen (siehe **Abb. 38**). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden diese Bedingungen mit den TBO-CA-Oberflächen (100 μM , 50 μM , 25 μM) mit der Lampe Teclas Source, Filter 2 (λ_{em} 550 – 750 nm) getestet.

Die Bestrahlung der TBO-CA-Oberflächen zeigte einen Phototoxizitätseffekt von 1 \log_{10} -Stufe (95,6%).

Mit der Lampe Teclas Source, Filter 2 konnte kein lichttoxischer Effekt auf die Bakterien festgestellt werden (**Abb. 41**).

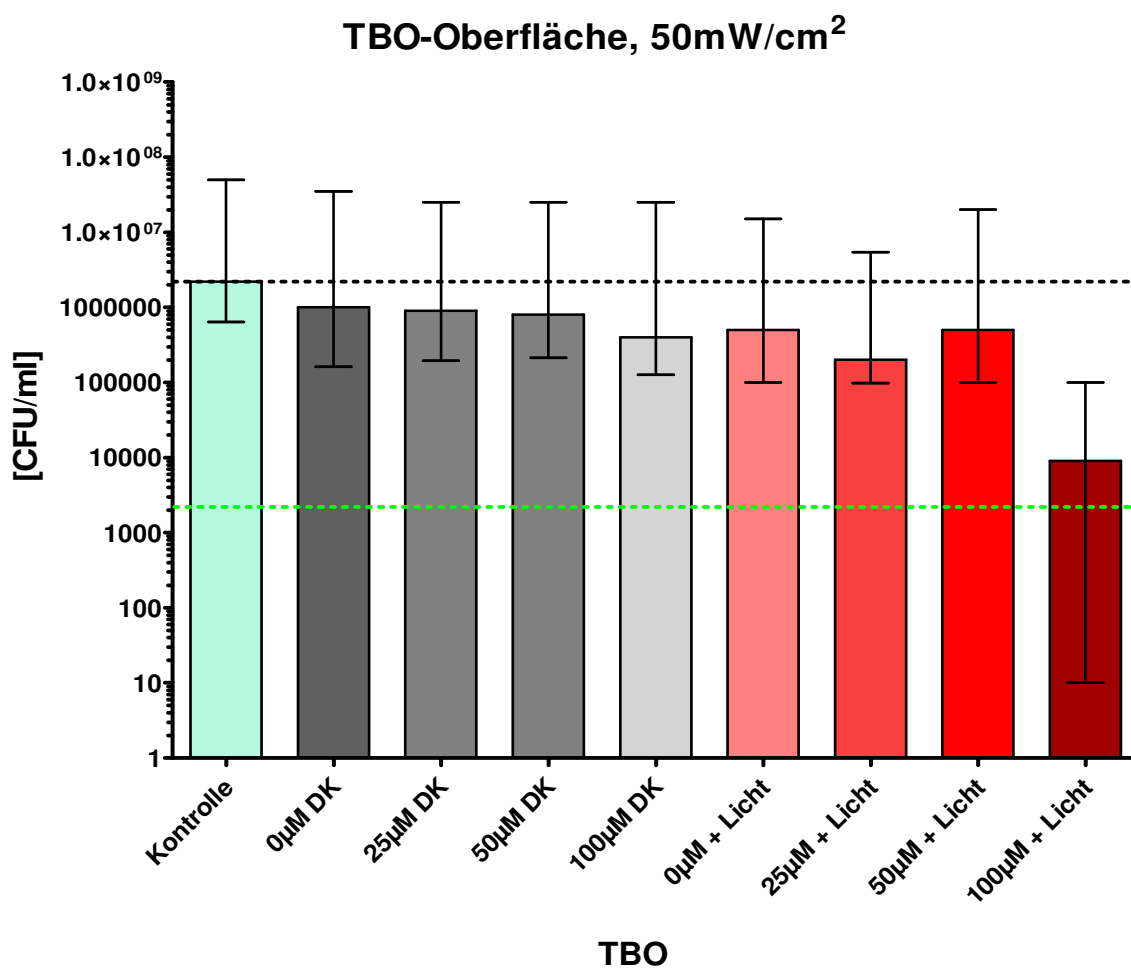


Abb. 41: Ergebnisse der Phototoxizitätstests der TBO-CA-Oberflächen (100 µM, 50 µM, 10 µM) gegenüber *S. aureus*. Bestrahlung der Proben mit 50 mW/cm² für 10 Minuten; Lampe Teclas Source, Filter 2. Hellblau: Kontrolle: Ausgangsbakterienmenge in Suspension als Referenzpunkt (\triangleq 100%), rote Balken: bestrahlte Bakterien ohne und mit TBO, graue Balken: Dunkelkontrolle: Bakterien ohne und mit TBO, ohne Bestrahlung; die Balken repräsentieren den Median von drei unabhängigen Experimenten, die die 25% und 75% Quartile enthalten. Werte unter der horizontalen grünen Linie entsprechen einer Reduktion der Bakterien um $\geq 99,9\%$ (3 log₁₀-Stufen).

6 Diskussion

Durch die Ausbreitung multiresistenter Erreger (MRE) in deutschen Krankenhäusern hat eine konsequente Hygiene einen noch höheren Stellenwert erhalten. MRE können leicht auf das Klinikpersonal von Patienten oder unbelebten Vektoren wie unsterilen Instrumenten oder kontaminierten Flächen und auf Patienten von besiedeltem Personal übertragen werden [39]. Vor allem immunsupprimierte Patienten auf deutschen Intensivstationen sind durch Infektionen mit MRE gefährdet, die, verursacht durch kontaminierte Medizinprodukte, wie invasive Katheter oder andere in den Körper eingebrachte Gegenstände, ein weitverbreitetes Problem darstellen. Der Hauptübertragungsweg zur Verbreitung von MRE und somit die Hauptursache zur Entstehung von nosokomialen Infektionen (NI) ist die mangelnde Händehygiene des Krankenhauspersonals. Mathai et al. konnten in einer Studie zur Hygieneerziehung des Krankenhauspersonals zeigen, dass allein Erziehungsprogramme zur verbesserten Händehygiene nicht ausreichen, um Infektionen und ihre Übertragung zu unterbinden [131-135].

Zur Verbesserung der Situation und zur Verhinderung von NI, könnten neue Technologien, wie selbstdesinfizierende Oberflächen, zukünftig einen Beitrag leisten. Zur Vermeidung von Infektionen wurden unter anderem bereits Katheter mit antimikrobiellen Beschichtungen wie Silber eingeführt [136].

Bei der Nutzung der PIB auf Oberflächen haben entstehende reaktive Sauerstoffspezies wie Singulett-Sauerstoff oder freie Sauerstoffradikale als toxisches Agens direkt Kontakt zu den Bakterien [118]. Durch die Bestrahlung der Oberfläche, in die ein Photosensibilisator (PS) eingearbeitet ist, soll durch die Anregung des PS in einen Triplett-Zustand Singulett-Sauerstoff entstehen, dieser aus der Oberfläche heraustreten und die Mikroorganismen durch Angriff auf die Zellwand und Zytoplasmamembran abtöten. So würde die Keimzahl auf Oberflächen beständig auf einem niedrigen Niveau gehalten werden. Dies würde die Verbreitungswahrscheinlichkeit der Keime vermindern und das Ziel, Infektionen zu kontrollieren und effizienter zu therapieren, könnte besser erreicht werden. Zudem hätte diese Methode zur Reduktion der Bakterien im Vergleich zu herkömmlichen alkoholischen Desinfektionsmitteln den Vorteil, dass keine Hygienelücke wie nach der Verdunstung der Desinfektionsmittel entsteht. Diese photodynamisch aktiven Oberflächen könnten nicht nur für Medizinprodukte eingesetzt werden, sondern auch auf inerten Oberflächen in Patientenzimmern, Stationszimmern, Operationssälen, Arbeitsräumen, etc. aufgebracht werden.

6.1 Phototoxizitätstests mit TMPyP gegen *S. aureus* in Suspension

Mit dem Einsatz des Referenzfarbstoffes TMPyP gegen *S. aureus* in Suspension wurde das Prinzip der PIB überprüft. Bei einer TMPyP-Konzentration von 1 μM , einer Inkubationszeit von 1 Minute und anschließender Bestrahlung (210 Sekunden) konnte eine Reduktion der Bakterien in der Suspension erzielt werden. Bei diesen Experimenten in Suspension konnte eine Inaktivierung von Bakterien um 99,999% (Reduktion um 5 \log_{10} -Stufen) durch den photodynamischen Prozess erzielt werden, sodass per Definition eine Desinfektion durch Photodynamik gegeben wäre [72].

Bei der PIB in Suspension wird als ein Hauptmechanismus der photodynamischen Wirkung davon ausgegangen, dass der PS während der Inkubation in der Nähe der Bakterienzellwand oder Zytoplasmamembran akkumulieren kann. Bei der nachfolgenden Bestrahlung unter aeroben Bedingungen entsteht der hochreaktive Singulett-Sauerstoff direkt am Angriffsziel [95]. Aufgrund der Singulett-Sauerstoff-Diffusionskapazität von 200 nm in Suspension wird der irreversible oxidative Schaden an den Bakterien nur in seiner unmittelbaren Nachbarschaft verursacht [97]. Ein weiterer Mechanismus, der durch Phototoxizität zum Zelltod führt, könnte ein irreversibler K^+ -Ausstrom aus den Bakterien, induziert durch die Bestrahlung, darstellen [137]. Ebenso denkbar wäre ein Efflux von Aminosäuren aus den Bakterien nach der Bestrahlung, was bei Propionibakterien, die auf einem mit ALA angereicherten Bakterienagar gewachsen waren, gezeigt werden konnte [138].

Diese Beispiele eines erfolgreichen Einsatzes der PIB setzen jedoch eine direkte Anlagerung oder Aufnahme des PS an oder in die Bakterien voraus. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals untersucht, ob ein in eine inerte Oberfläche eingebrachter PS durch Lichtinduktion in der Lage ist, ohne direkten Kontakt zu den Bakterien, eine photodynamische Toxizität zu induzieren und die auf die Oberfläche aufgebrachten Keime zu inaktivieren.

6.2 Spektroskopische Untersuchungen der CA-Oberflächen

Bei den Ergebnissen der spektroskopischen Untersuchungen der CA-Oberflächen hinsichtlich einer Herauslösung der PS-Moleküle konnte gezeigt werden, dass ein lipophiler PS, wie beispielsweise TPP oder MB-S2, in die Kunststoffoberfläche eingearbeitet werden muss, um eine stabile durchsichtige Oberfläche zu erhalten, in der der PS makroskopisch gleichmäßig verteilt ist.

Im Rahmen der Untersuchungen wurde zudem gezeigt, dass sich hydrophile PS, eingearbeitet in die CA-Oberfläche in dem Lösungsmittel *Aqua dest.*, aus dieser herauslösen. Die lipophilen PS TPP und MB-S2 zeigten in dieser Hinsicht den stabilsten Verbund mit der Polymermatrix und konnten nicht herausgelöst werden. Die hydrophilen PS, wie TMPyP, MB oder TBO, könnten somit bei der Kontamination der CA-Oberfläche mit der wässrigen Bakteriensuspension direkten Kontakt mit den Bakterien eingehen, sodass eine photodynamische Reaktion wie in Suspension ablaufen könnte.

Ein stetiger PS-Verlust könnte die Oberfläche zudem mit der Zeit unwirksam machen. Bei allen hydrophilen PS konnte ein Austritt aus der Oberfläche detektiert werden. Jedoch veränderte sich nach dem Einlegen der Oberfläche für zwei Stunden in 10 ml *Aqua dest.* als Lösungsmittel das Absorptionsspektrum der PS in der Oberfläche nicht. Dies deutet daraufhin, dass die Kunststoffoberfläche mit dem hydrophilen Farbstoff gesättigt war und sich keine Moleküle aus dem Kunststoffgitter lösten, sondern nur solche, die nicht fest in die Matrix gebunden waren und sich so im *Aqua dest.* lösen konnten. Dass sich nicht alle PS-Moleküle in die Polymermatrix integrieren konnten, ist unter anderem durch das unterschiedliche Lösungsverhalten der vermischten Substanzen zu erklären. Eine Ausnahme stellt dabei der PS TBO dar. Bei der spektroskopischen Untersuchung der TBO-Oberfläche nach dem Einlegen in das Lösungsmittel *Aqua dest.* konnte ein Rückgang des Absorptionsmaximums detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass sich TBO aus der Matrix der CA-Platte mobilisieren kann und die TBO-Kunststoffplatte mit der Zeit ausbleicht.

Bei den Vergleichen der Absorptionsmaxima der PS in Lösung und in den CA-Oberflächen konnte bei den spektroskopischen Untersuchungen der Porphyrin-Derivate TPP und TMPyP keine Veränderungen der Absorptionsspektren hinsichtlich einer Verschiebung der Absorptionsmaxima festgestellt werden. Ausschließlich der Bereich der Maximalabsorption verschmälerte sich, bedingt durch die Dimerisierung der PS-Moleküle in der Polymermatrix [130]. Bei den PS MB, MB-S2, MB-S3 und TBO fand eine Verschiebung der Absorptionsmaxima in den CA-Oberflächen statt,

was auf eine stärkere Aggregation der PS-Moleküle in der Polymermatrix schließen lässt. Möglicherweise überlagern sich die PS-Moleküle in dem Oberflächenfilm und bilden Konglomerate. Dadurch können sich die aromatischen Ringsysteme der PS überlagern. Dieses Phänomen und die Verminderung der maximalen Absorption dieser PS in den CA-Oberflächen im Vergleich zu den PS in Suspension führt bei der Anregung der PS durch Licht zu einer geringeren Aktivierung dieser in die angeregten Triplett-Zustände. Dadurch können weniger Sauerstoffmoleküle zu Singulett-Sauerstoff überführt werden und die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute kann erheblich sinken.

Die Verwendung der Phenothiazinderivate für die Einarbeitung in die CA-Oberflächen und für eine erfolgreiche photodynamische Oberflächendesinfektion wird aufgrund der divergenten Ergebnissen aus den hier erzielten Ergebnissen und den publizierten Daten kontrovers diskutiert [117, 118]. Bei den spektroskopischen Untersuchungen zur Herauslösung der Farbstoffe aus den Kunststoffoberflächen wurde bei Decraene et al. 1,0 ml PBS-Puffer als Lösungsmittel auf die TBO-RB-Oberflächen pipettiert. In dem PBS-Puffer als Lösungsmittel wurde eine Absorption entsprechend der Absorptionsmaxima der PS von $A_{632\text{ nm}} < 0,009$ bei TBO und von $A_{545\text{ nm}} < 0,003$ bei RB detektiert. Decraene et al. gehen bei ihren durchgeführten Phototoxizitätsversuchen nicht von einer photodynamischen Reaktion wie in Suspension aus [117]. In der vorliegenden Doktorarbeit wurden spektroskopisch TBO-Partikel im Lösungsmittel *Aqua dest.* detektiert. Die Absorption lag bei einer TBO-Konzentration von 100 μM mit bei 3,8% und bei einer TBO-Konzentration von 25 μM bei 0,15%, was zeigte, dass sich Farbstoffmoleküle aus der Oberfläche herauslösten. Demnach konnte bisher nicht geklärt werden, ob der phototoxische Effekt der TBO-RB-Oberflächen in der Publikation von Decraene et al. direkt durch die gelösten PS-Moleküle oder indirekt durch Singulett-Sauerstoff erzeugt wurde [117]. Durch die Unterschiede der verwendeten Methode zur Messung der herausgelösten PS-Moleküle in der Publikation von Decraene et al. und in dieser Doktorarbeit konnten keine exakten Vergleiche des Ausbleichen der CA-Oberflächen in Lösungsmitteln betreffend gezogen werden, da sich die verwendeten Mengen der Lösungsmittel (Decraene 1 ml PBS, vorliegende Doktorarbeit 10 ml *Aqua dest.*) unterschieden. In den Publikationen von Decraene et al. fehlen zudem Angaben zur Inkubationszeit der CA-Oberflächen mit PS in dem Lösungsmittel PBS [117].

Die phototoxische Wirkung von TBO in Suspension gegen pathogene Organismen einschließlich Bakterien [139, 140], Hefen [141] und Viren [142] ist bekannt. Eine phototoxische Wirkung von TBO in einer Bakteriensuspension ist bereits ab einer Konzentration von 0,01 mg/ml bis 1 mg/ml und einer Bestrahlungsenergie ab 6 J/cm²

beschrieben [143]. Somit ist durch ein Herauslösen einer geringen Menge an TBO-Molekülen aus der Oberfläche eine phototoxische Reaktion in Suspension und somit eine PIB denkbar.

In Suspension gibt es zwei denkbare Interaktionen der PS mit den Bakterien. Entweder wird der PS direkt in das Bakterium aufgenommen und kann dort seine Wirkung entfalten. Oder die photodynamische Reaktion findet außerhalb des Bakteriums in der unmittelbaren Nähe der Angriffsziele statt. Beide Prozesse können in Suspension auch simultan stattfinden. Die photodynamische Reaktion in der Nähe der Zellmembran ist bei der Oberflächendesinfektion wahrscheinlich. In diesem Fall kommt es durch die Oxidationsvorgänge induziert durch Singulett-Sauerstoff an der Zellwand bzw. der Zellmembran zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials und damit zur PIB [101].

Bei der Langzeitbestrahlung der Oberfläche mit TPP für 100 Minuten und einer resultierenden Gesamtenergie von 300 J/cm^2 wurde keine Abnahme des Absorptionsmaximums der Soret-Bande festgestellt. Der Bereich der maximalen Absorption der Soret-Bande verschmälerte sich jedoch, was darauf schließen lässt, dass Farbstoffmoleküle durch die Bestrahlung zerstört wurden und der PS eingearbeitet in die Oberfläche durch Langzeitbestrahlung ausbleicht.

Die Anregung des Farbstoffes durch die verwendete Lampe OmniCure® Series 2000 erfolgte im Bereich von 390 nm bis 500 nm mit zwei Emissionsmaxima bei 405 nm und 436 nm. Somit überlagerten sich die Emissionsmaxima mit dem Absorptionsbereich der Soret-Bande von TPP in der CA-Oberfläche (415,5 - 418,5 nm) nicht genau. Das Absorptionsspektrum von TPP in Lösung und in der CA-Oberfläche glich sich annähernd. Dadurch zeigte sich, dass der TPP-CA-Verband bei der Bestrahlung stabil blieb und die Farbstoffmoleküle nicht zerstört wurden.

Im Bereich der Q-Banden des Porphyrins TPP konnte eine Art Ausbleichen des Farbstoffs in der CA-Oberfläche in Form eines Rückgangs der Absorptionsmaxima dieser Banden gezeigt werden. Dieser Effekt ist bei längerer Bestrahlungszeit und hoher applizierter Energie zu beobachten und kann durch die vermehrte Entstehung von Singulett-Sauerstoff erklärt werden [144].

Da bei jedem Versuch neue CA-Oberflächen verwendet wurden, konnte von gleichbleibenden Bedingungen, die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute betreffend, ausgegangen werden.

6.3 Singulett-Sauerstoff-Generierung der PS in den CA-Oberflächen

Für eine effektive Singulett-Sauerstoff-Generierung durch einen PS sind der Einlagerungsort in der Kunststoffoberfläche und die davon beeinflussten photophysikalischen und spektroskopischen Eigenschaften des PS entscheidend. Durch die kontinuierliche Bewegung auf dem Orbitalshaker Certomat®R sollte eine möglichst gleichmäßige Verteilung des PS im CA-Aceton-Gemisch während des Polymerisationsprozesses gewährleistet werden, um unter anderem eine Agglomeratbildung des PS zu verhindern.

In polaren Lösungsmitteln wie Wasser oder Ethanol beträgt die Lebensdauer von Sauerstoff im Singulett-Zustand wenige Mikrosekunden. In Wasser beträgt sie $3,5 \pm 0,5 \mu\text{s}$, in Lipidlösung (Phosphatidylcholin) $9 \pm 2 \mu\text{s}$, in Phospholipidmembranen $14 \pm 2 \mu\text{s}$ und bei mit Photofrin inkubierten *S. aureus* $6 \pm 2 \mu\text{s}$ [128, 145].

Die Abklingzeit und somit die Diffusionsreichweite von Singulett-Sauerstoff in der Oberfläche ist von mehreren Faktoren abhängig. Die Art des Polymers beeinflusst die physikalisch-chemischen Eigenschaften des PS, die Permeabilität für Sauerstoff und dementsprechend die Konzentration von Sauerstoff im Material und damit die Effektivität der Singulett-Sauerstoff-Generierung. Die Veränderungen der spektroskopischen Eigenschaften des PS im Polymermaterial könnten somit zu einer anderen Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute als in Suspension führen.

Die Quantenausbeuten wurden bisher noch nicht explizit bestimmt, da keine Vergleichsmöglichkeiten sowohl mit literaturbekannten Werten als auch mit eigenen Daten der Forschungsgruppe möglich sind. In nachfolgenden Untersuchungen der Forschungsgruppe von Prof. W. Bäumler (Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg) sollen die Quantenausbeuten in Festkörpern erstmals gemessen werden. Allerdings konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit erstmals eine wesentlich höhere Intensität des Lumineszenzsignals bei 1270 nm im Vergleich zur Signalintensität von Singulett-Sauerstoff erzeugt in wässrigen Suspensionen detektiert werden, was auf eine effektive Singulett-Sauerstoff-Generierung im Polymermaterial schließen lässt.

Aufgrund der Diffusionseigenschaften der CA-Matrix für Sauerstoff wäre es ebenfalls denkbar, dass ein Großteil der Singulett-Sauerstoff-Moleküle in dem Material entsteht, aber aufgrund einer zu kurzen Diffusionsweite nicht aus ihm heraustreten kann. Gemäß dieser Annahme wäre kein phototoxischer Effekt auf Mikroorganismen zu erwarten, was jedoch in der vorliegenden Arbeit und in der Literatur widerlegt werden konnte [117, 146].

Singulett-Sauerstoff-Messungen an Luft lassen auf eine Singulett-Sauerstoff-Abklingzeit im Millisekundenbereich schließen [97, 147]. Aufgrund des technischen Aufbaus zum direkten Nachweis von Singulett-Sauerstoff ist das zeitliche Messfenster für die Lumineszenzdetektion jedoch beschränkt auf den Mikrosekundenbereich. Die Lumineszenz des eventuell in Luft deaktivierten Singulett-Sauerstoffs verschwindet somit im Grundrauschen des Signals und ist außerhalb der Nachweisgrenzen des Detektionssystems.

Dennoch können indirekte Nachweismethoden dienlich sein für den aus der Polymermatrix heraus diffundierenden Singulett-Sauerstoff. Als einer dieser indirekten Nachweise für Singulett-Sauerstoff werden in dieser Arbeit die Ergebnisse der Phototoxizitätstests mit den TPP-CA-Oberflächen angesehen. Bei der erfolgreichen photodynamischen Inaktivierung der Bakterien auf der CA-Oberfläche stand der PS TPP nicht in direktem Kontakt mit den Bakterien, sondern war stabil in die CA-Polymermatrix eingebunden und der photodynamische Effekt zur Inaktivierung der Bakterien wurde bei Bestrahlung indirekt durch Singulett-Sauerstoff verursacht.

6.4 Versuche zur PIB auf den CA-Oberflächen

In dieser Arbeit konnten verschiedene PS aus der Gruppe der Porphyrine, Phenothiazine und Perinaphthenone in die Kunststoffoberfläche bestehend aus einem CA-Aceton-Gemisch eingearbeitet werden. Anschließend wurden Bakterien (*S. aureus*) auf diese Oberfläche aufgebracht und der photodynamische Effekt unter verschiedenen Bedingungen evaluiert.

Phototoxizitätsversuche mit den TPP-CA-Oberflächen

Bei der Bestrahlung der TPP-Oberflächen konnte bei einer Konzentration von 250 μM und einer applizierten Gesamtenergie von 30 J/cm^2 der größte Inaktivitätseffekt gegenüber *S. aureus* gemessen werden. Es konnte eine Reduktion der KBE bis annähernd 99% (2 \log_{10} -Stufen) gezeigt werden, die jedoch für eine klinische Desinfektion (5 \log_{10} -Stufen) nicht ausreichend ist. Für den klinischen Einsatz oder Verwendung in der Lebensmittelindustrie ist die Inaktivierung von Mikroorganismen durch die Kunststoffoberflächen mit TPP ebenfalls nicht ausreichend.

TPP zeigte bei den spektroskopischen Untersuchungen keine Verschiebungen des Absorptionsmaximums und keine Abnahme der maximalen Absorption im Bereich der Soret-Bande. Jedoch verschmälerte sich dort der Bereich der Maximalabsorption, was auf einen verringerten Schwingungsbereich der PS-Moleküle und eine

Aggregation hindeutet. Im Vergleich zu den anderen PS aggregiert TPP dennoch nicht verstärkt und kann in der CA-Oberfläche ausreichend in den Triplett-Zustand angeregt werden und dadurch eine effiziente Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute zur PIB ermöglichen.

Bei der Bestrahlung der Bakterien auf der CA-Oberfläche ohne PS mit einer hohen Energiedosis (60 J/cm^2) wurde eine Inaktivierung der Bakterien bis zu 4 \log_{10} -Stufen gemessen. Eine mögliche Ursache dafür könnte die schnelle Austrocknung der Bakterien durch Hitze sein, wodurch die Bakterienzelle zu schnell Wasser verliert. Dies steht im Gegensatz zu der bekannten Widerstandsfähigkeit von *S. aureus* gegen Austrocknung [35]. Zudem sind die Lichtintensitäten für die PIB gering und verursachen im Normalfall keine thermischen Reaktionen, die Auswirkungen auf die Bakterien haben könnten [101], wie auch in dieser Arbeit überprüft wurde (maximaler Temperaturanstieg $2,5 \text{ }^\circ\text{C}$).

Die maximale Absorption ($>80\%$ Absorption bis 504 nm) der *S. aureus*-Suspension befindet sich in den Bereichen mit niedrigen energiereichen Wellenlängen. Das Absorptionsspektrum von *S. aureus* weist im Bereich des Emissionsspektrums der Lampen UV 236 (λ_{em} $380 - 480 \text{ nm}$) und OmniCure® Series 2000 (λ_{em} $390 - 500 \text{ nm}$) die höchste Absorption (bei 400 nm 87%) des Lichts auf. Diese Faktoren können zu einer Abtötung der Bakterien allein durch die Bestrahlung führen. Diese Annahme konnte bei dem Einsatz der Lampe Teclas Source Filter 2 (λ_{em} $550 - 750 \text{ nm}$) bestätigt werden, da mit dieser Lampe (längerwelliges Licht) keine Bakterien durch Licht allein inaktiviert wurden.

Bakterien können aufgrund ihrer endogenen PS wie Flavine, Cytochrom und NADH durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht vor allem im blauen Spektralbereich und der darauffolgenden Entstehung von ROS abgetötet werden [148, 149]. Es ist bekannt, dass beispielsweise *Porphyromonas gingivalis* oder *Propionibacterium acnes* [150] endogene Porphyrine produzieren und somit durch eine Lichtapplikation allein, ohne weitere PS-Inkubation, photodynamisch inaktiviert werden können [151-153]. Einige *S. aureus*-Stämme enthalten ebenfalls endogene PS wie Porphyrine und Carotinoide [148]. Auf diese Weise könnte durch das natürliche Vorhandensein von PS in *S. aureus* die Lichttoxizität bei höheren Lichtdosen (ab 60 J/cm^2) erklärt werden, ohne dass ein PS zusätzlich in die Oberfläche integriert werden musste [118, 148]. Bei der PIB in Suspension war in den Versuchen mit TMPyP gegen *S. aureus* in den Kontrollen (bestrahlte Probe ohne PS) kein lichttoxischer Effekt festzustellen. Eine mögliche Erklärung könnte die zu geringe Lichtdosis (max. $10,5 \text{ J/cm}^2$) bei diesen Versuchen sein, die nicht ausreichte, um die endogenen PS zu aktivieren.

Das Emissionsspektrum der Lampe OmniCure®Series 2000 mit zwei Emissionsmaxima bei 405 nm und 436 nm war nicht genau auf das Absorptionsmaximum der Soret-Bande bei TPP (420 nm) abgestimmt, was dazu führte, dass die Anregung der TPP-Moleküle in den Triplett-Zustand nicht optimal war und somit nicht die maximale Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute erreicht werden konnte. Durch eine Angleichung der Spektren wäre in weiteren Versuchen eine Verbesserung der Ergebnisse denkbar. Um eine optimale Anregung der PS-Moleküle durch Lichtabsorption in den angeregten T_1 -Zustand und somit eine höhere Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute zu erreichen, ist der Überlappungsbereich des Emissionsspektrums der Lampe mit dem Absorptionsspektrum des PS effizienzbestimmend. Der Überlagerungsbereich könnte bei der Anregung von TPP-Molekülen bei weiteren Versuchen zur Effizienzsteigerung der Phototoxizitätsversuche durch die Verwendung einer anderen Lampe mit optimiertem Emissionsspektrum verbessert werden.

Damit die PIB ihre Wirkung entfalten kann, muss sichergestellt werden, dass das Licht die Zielsubstanz, also den PS, erreichen kann. Licht wird beim Auftreffen auf eine Oberfläche entweder gestreut oder absorbiert. Ein limitierender Faktor für die Eindringtiefe zur Zielsubstanz ist die Lichtstreuung. Der Effekt der photodynamischen Inaktivierung von Mikroorganismen ist durch eine selbstdesinfizierende Oberfläche am höchsten, wenn diese klar ist. Trübe Lösungen können die Lichtintensität um das 100-1000fache erniedrigen [101]. Eine Absorption des Lichts in tiefere Schichten der Oberfläche kann zudem durch den PS selbst verhindert werden, wenn dieser das Licht nahezu komplett absorbiert [154]. Daher ist es wichtig, einen optimalen Konzentrationsbereich des verwendeten PS zu wählen, um eine effiziente Anregung möglichst vieler Moleküle und eine hohe Quantenausbeute an Singulett-Sauerstoff zu erreichen [101]. Die auf die CA-Oberfläche pipettierten Bakterien in *Aqua dest.* wurden in Tropfenform (50 µl) getrocknet und nicht auf der Oberfläche verteilt. Die trübe Bakterienschicht wurde lokalisiert bestrahlt. Dadurch konnte die applizierte Lichtintensität die darunterliegenden PS-Moleküle eventuell nicht in voller Stärke erreichen, da die aufgetragenen Bakterien selbst das Licht absorbieren oder streuen konnten. Aufgrund dessen konnten darunter liegende PS-Moleküle nicht mit der vollen Lichtintensität angeregt werden, was die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute erheblich mindern könnte.

Zur Verbesserung der Ergebnisse der Phototoxizitätstests mit den TPP-Oberflächen wurde eine fraktionierte Bestrahlung der CA-Oberflächen mit TPP durchgeführt, vor dem Hintergrund eventuell verbrauchten Sauerstoff in der Umgebung wieder zu regenerieren und alle PS-Moleküle wieder in den Grundzustand relaxieren zu lassen.

Nach Maisch et al. muss die Effizienz der Singulett-Sauerstoff-Bildung vom Sauerstoffpartialdruck in der Umgebung abhängen, da es durch die photodynamische Reaktion zum lokalen Sauerstoffverbrauch kommt [93]. Die Lumineszenz-Leistung von Singulett-Sauerstoff bei 1270 nm wird zur vorherrschenden Singulett-Sauerstoff-Konzentration als proportional angenommen [145]. Die Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz gilt somit als Indikator für den aktuellen Sauerstoffpartialdruck, wodurch man die lokal herrschende Sauerstoffkonzentration abschätzen kann. Eine fraktionierte Bestrahlung der TPP-Oberflächen führte jedoch nicht zu einer Verbesserung der Phototoxizität. Nach Brovko et al. kann Sauerstoff kein limitierender Faktor sein, da er in ausreichenden Mengen immer ubiquitär gegeben ist. Den Hauptfokus in der Wirksamkeit der PIB in Suspension sieht er in der Interaktion von PS und Angriffsziele wie Bestandteilen der Zytoplasmamembran [101]. Die PIB auf Oberflächen steht jedoch im Gegensatz zu dieser Annahme, da dort nur Singulett-Sauerstoff und nicht der PS in Kontakt zu den Mikroorganismen steht und diese inaktiviert.

Phototoxizitätsversuche mit den Phenothiazin-CA-Oberflächen

Für die Herstellung der CA-Oberflächen mit PS wurden neue lipophile MB-Derivate MB-S1, MB-S2 und MB-S3 in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für organische Chemie (Prof. B. König) der Universität Regensburg von Dr. rer. nat. Andreas Späth synthetisiert. Diese Farbstoffe sollten sich besser als die hydrophile Ausgangssubstanz MB in die lipophile CA-Oberfläche einarbeiten lassen.

Mit MB konnten keine stabilen CA-Oberflächen mit ausreichend hoher PS-Konzentration (maximal 50 μM) für eine Testung der Phototoxizität hergestellt werden. Zudem war ein Herauslösen des MB aus der Polymermatrix mit einer Absorption von 2,7% im Lösungsmittel *Aqua dest.* zu detektieren. Daher wurden keine CA-Oberflächen mit MB für die Phototoxizitätstests eingesetzt.

Der Farbstoff MB-S1 reagierte bei der Einarbeitung in die CA-Oberfläche mit dem Aceton und verfärbte sich braun. Mit dieser Art von Polymer-PS-Gemisch konnten keine Phototoxizitätsversuche durchgeführt werden und weitere Studien mit anderen Polymeren könnten zeigen, ob der PS in Oberflächen phototoxisch einsetzbar sein wird.

Das MB-Derivat MB-S2 (100 μM) zeigte, eingebracht in die Kunststoffoberflächen, bei der Bestrahlung mit 90 J/cm^2 (Lampe Teclas Source, Filter 2), also dreimal so viel Energie wie bei den TPP-CA-Oberflächen (30 J/cm^2), eine Inaktivierung der Bakterien um 94% (1 \log_{10} -Stufe).

Aufgrund des Lösungsverhaltens von MB-S3 musste bei der Herstellung der Kunststoffoberflächen als Lösungsmittel DMSO verwendet werden. Bei den Phototoxizitätsversuchen konnten sowohl von der Dunkelkontrolle als auch von den bestrahlten CA-Oberflächen durch die verwendete Methode zur Wiederfindung der Bakterien keine Bakterien kultiviert werden. Es ist möglich, dass durch das Lösungsmittel DMSO durch eine Reaktion mit Aceton das ausgehärtete Polymermaterial verändert wurde, für die Bakterien durchlässig wurde und die Bakterien in oder durch die CA-Polymermatrix diffundieren konnten. In weiteren Versuchen könnte der Phototoxizitätseffekt einer Oberfläche mit MB-S3 durch den Einsatz eines anderen Lösungsmittels oder eines anderen Polymers überprüft werden.

Bei den Phototoxizitätstests mit den CA-Oberflächen, die TBO enthielten, konnte eine Inaktivierung von *S. aureus* von 1 log₁₀-Stufe (95,6%) bei einer TBO-Konzentration von 100 µM erzielt werden. Die Konzentration 100 µM war die höchste herzustellende Konzentration in den TBO-CA-Oberflächen, da TBO ein hydrophiler Farbstoff ist und sich schlecht in das hydrophobe Cellulose-Acetat-Aceton-Gemisch integrieren ließ. Bei höheren Konzentrationen wurde die CA-Oberfläche zunehmend instabil und trüb. Zudem konnten bei der spektroskopischen Messung in *Aqua dest.* als Lösungsmittel eine Herauslösung des PS aus der CA-Oberfläche bereits ab der Konzentration von 25 µM TBO in der Oberfläche detektiert und eine nachfolgende Veränderung des Absorptionsspektrums von TBO in der CA-Oberfläche gemessen werden.

Phototoxizitätsversuche mit den PN-CI-CA-Oberflächen

Die Bestrahlung der CA-Oberflächen ohne PS mit der Lampe UV 236 Waldmann Medizintechnik (λ_{em} 380 - 480 nm) hatte einen lichttoxischen Effekt auf die Bakterien von 2 log₁₀-Stufen (99,2%). Die Lampe UV 236 Waldmann Medizintechnik ermöglicht eine maximale Bestrahlungsintensität von 15,3 mW/cm² wodurch längere Bestrahlungszeiten (bis zu 83,3 Minuten) resultierten, um die gleiche Energie (30 J/cm²) zu applizieren wie bei den erfolgreichen Phototoxizitätsversuchen mit den TPP-CA-Oberflächen. Dies und die hohe Absorption von *S. aureus* im niedrigen Wellenlängenbereich könnten zu der hohen Lichttoxizität der Lampe führen.

Durch die unterschiedlichen Absorptionsspektren der eingesetzten PS mussten die zur Bestrahlung verwendeten Lampen nach ihren Emissionsspektren ausgesucht werden und es konnte nicht die gleiche Lampe für alle PS-Oberflächen verwendet werden. Dadurch konnten keine gleichbleibenden Bedingungen geschaffen werden.

Bei den Vergleichen der Absorptionsspektren und der Absorptionsmaxima von PN-CI in Lösung und in der CA-Oberfläche fand eine Verschiebung der Absorptionsmaxima

in den CA-Oberflächen statt. Die PN-CI-Moleküle in der CA-Polymermatrix scheinen aufgrund einer Verschiebung des Absorptionsmaximums und einer deutlichen Abnahme der maximalen Absorption (38,42%) in den CA-Oberflächen zu aggregieren. Dadurch werden weniger eingearbeitete PS-Moleküle durch Licht in die Triplett-Zustände angeregt und die mögliche maximale Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute kann nicht erreicht werden. Dies könnte ein weiterer Grund sein, dass bei den PN-CI-CA-Oberflächen keine Phototoxizität gegenüber *S. aureus* gezeigt werden konnte.

6.5 Oberflächendesinfektion durch antimikrobielle Materialien

In anderen Arbeitsgruppen beispielsweise von Decraene et al. und Wainwright et al. wurden Versuche mit selbstdesinfizierenden Oberflächen durchgeführt und Polymere mit eingearbeiteten PS erfolgreich gegen Gram(+) und Gram(-) Bakterien eingesetzt [117, 118, 155]. Die Gruppe von Decraene et al., an deren Methode sich die vorliegende Arbeit orientiert hat, stellten eine Oberfläche aus einem Cellulose-Acetat-Aceton-Gemisch (50 mg/ml) her, die zwei PS TBO und Bengalrosa (Rose Bengal, RB) der Konzentrationen 25 μM enthielten [117]. Diese Gruppe testete die CA-Oberflächen gegen die Mikroorganismen *S. aureus*, MRSA, *E. coli*, *Candida albicans*, *Clostridium difficile* und einen Bakteriophagen und erreichten eine Inaktivierung von 0,1 – 6,7 \log_{10} -Stufen bei einer Bestrahlungszeit von 16 Stunden. In weiteren Studien mit den CA-Oberflächen, die TPP enthalten, könnte überprüft werden, ob diese ebenfalls einen Phototoxizitätseffekt gegenüber Gram(-) Bakterien, Hefen und Bakteriophagen zeigen. Zudem setzten Decraene et al. die Kunststoffoberflächen unter klinischen Bedingungen gegen in Krankenhäusern vorkommende Keime ein [156]. Die Lichtquelle war eine in Krankenhäusern in Großbritannien gebräuchliche Neonstoffröhre mit der Intensität von $3700 \pm 20 \text{ lux}$ ($\sim 0,2 \text{ mW/cm}^2$) für 16 Stunden, was einer applizierten Gesamtenergie von annähernd $11,52 \text{ J/cm}^2$ entspricht. Obwohl eine größere Konzentration an TBO (100 μM) eingesetzt wurde, konnten in den Phototoxizitätstests mit den TBO-CA-Oberflächen in der vorliegenden Doktorarbeit nur eine geringere Bakterienreduktion erzielt werden (1 \log_{10} -Stufe).

Die Emissionsmaxima der Neonstoffröhre lagen bei 435 nm, 495 nm, 545 nm, 588 nm und 610 nm. Durch den Einsatz von zwei PS in der CA-Oberfläche, die in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen absorbieren, erhöht sich der Bereich der maximalen Absorption und mehr PS-Moleküle können gleichzeitig in Triplett-Zustände angeregt werden, wodurch sich die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute erhöht [117]. Zudem liegt dieser kombinierte Bereich der maximalen Absorption (λ_{abs}

500 - 675 nm) der beiden PS RB und TBO genau im Bereich von drei Emissionsmaxima (545 nm, 588 nm, 610 nm) der Neonstoffröhre. Durch das Überlappen der beiden Absorptionsmaxima erhöht sich die Effektivität dieser CA-Oberfläche. Darin könnte ein Grund für den besseren Phototoxizitätseffekt in der Publikation von Decraene et al. liegen. Das Emissionsmaximum der Lampe Teclas Source mit dem Filter 2 (E_{\max} 650 nm) überlappt das Absorptionsmaximum von TBO (A_{\max} 630 nm) nicht. Dies hat zur Folge, dass die Anregung der PS-Moleküle in Triplett-Zustände und somit die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute nicht optimal und vermutlich geringer als bei den Versuchen zur Phototoxizität der TBO-RB-Kunststoffoberfläche von Decraene et al. ist [117, 118].

Das weiße, sichtbare Licht der Neonstoffröhre ist nicht so energiereich wie das der Lampen in der vorliegenden Arbeit. Ein exakter Vergleich aus den vorhandenen Daten zur verwendeten Lichtquelle und applizierten Lichtenergie in der Studie von Decraene et al. mit denen in der vorliegenden Arbeit ist nicht ausreichend möglich, da keine einheitlichen Dosimetrien (lux im Vergleich zu J/cm^2) verwendet wurden. Trotzdem berichtet auch diese Gruppe von einem Bakterienverlust bei den bestrahlten CA-Oberflächen ohne PS um bis zu 72,4%, was in der Publikation von Decraene et al. jedoch nicht als signifikant angesehen wird [118]. Nach Decraene et al. ist eine photodynamische Inaktivierung von Gram(+) Bakterien durch photodynamisch aktive Kunststoffoberflächen, in die die Farbstoffe TBO und RB eingearbeitet sind, effektiv mit Neonlicht zu erreichen [118]. Aerobe Spezies konnten bei den Versuchen von Decraene et al. zu 63,8% und anaerobe zu 81,8% abgetötet werden [156]. Auf diese Weise können diese photodynamisch aktiven Oberflächen mit TBO und RB die Keimlast zwar reduzieren, aber keine komplette Inaktivierung im Sinn einer erfolgreichen Desinfektion erzielen.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der Bakterien auf den bestrahlten CA-Oberflächen wurden bei Decraene et al. die lebenden Bakterien nach der Bestrahlung kultiviert, indem die Petrischale mit der bestrahlten Oberfläche direkt mit Agar aufgefüllt wurde. Nachdem dieser fest war, wurde die Schale in Folie verpackt, für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und die KBE ausgezählt [118]. Aufgrund der Datenlage in der Publikation von Decraene et al. ist die Effizienz und Reproduzierbarkeit der Methode nicht zu bewerten und somit nicht mit der Methode, die in dieser Doktorarbeit verwendet wurde, zu vergleichen. Eine optimale Wiederfindungsrate läge bei 100%, die mit der Methode aus der vorliegenden Doktorarbeit nicht zu erreichen war. Es wurde in den Versuchen zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der Bakterien ein minimaler Verlust von 12% und ein maximaler von 44% gezeigt, was die Aussagekraft über die inaktivierten Bakterien auf den CA-Oberflächen in den

Phototoxizitätsversuchen einschränkt. Durch eine Verbesserung der Methode könnte ein Gewinn der Effizienz von 1 log₁₀-Stufe erzielt werden.

Ebenso im Einsatz für selbstdesinfizierende Oberflächen befindet sich Nanosilber. Unter Nanosilber versteht man maximal 100 nm große Partikel von elementarem Silber. Silber ist durch das positiv geladene Silberion Ag⁺, das bei Kontakt mit Feuchtigkeit durch Oxidation entsteht, bekannt für seine breite antimikrobielle Wirksamkeit, wobei Gram(-) Bakterien eine niedrigere minimale Hemmkonzentration (MHK-Wert) (75 µg/ml) aufweisen als Gram(+) Bakterien (100 µg/ml) [157, 158]. Silber-Ionen wirken gegen ein breites Spektrum von Gram(+) und Gram(-) Bakterien einschließlich MRSA und VRE [159]. Der genaue Wirkmechanismus, der anschließend zum Absterben der Mikroorganismen, führt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch lösen sich die Silbernanopartikel aus der beschichteten Oberfläche und diffundieren frei in die Bakterien, da Silbernanopartikel Zellmembranen durchdringen können. Dort verweilen sie eine gewisse Zeit und setzen kontinuierlich Silberionen frei [160]. Im Gegensatz dazu steht der Wirkmechanismus der selbstdesinfizierenden photodynamisch aktiven Oberflächen. Lipophile PS wie TPP, eingearbeitet in die CA-Oberfläche, lösen sich nicht aus dieser. Die antimikrobielle Wirkung wird indirekt durch den energiereichen Singulett-Sauerstoff vermittelt.

Abhängig von der Dosis, der Dauer der Belastung und der Art der Aufnahme kommt es zu Nebenwirkungen durch Silber wie Magen- und Leberschäden und zu neurotoxischen Wirkungen [161]. Nanosilber im Besonderen kann eine Schädigung der DNA verursachen [162]. Silber wird im Körper zudem teilweise akkumuliert. Genaue Daten zu Schwellenwerten und Dosis-Wirkungsbeziehungen existieren nicht und die schädliche Wirkung von Silbernanopartikeln ist vor allem aus Tierversuchen bekannt.

Nanosilber wird in der Medizin in Wundverbänden und Beschichtungen von Kathetern und Implantaten aufgrund der antimikrobiellen Wirkung auch gegen resistente Erreger eingesetzt. Silberionen sollten in Wundauflagen kontinuierlich und in ausreichend hoher Menge von 70 - 100 ppm freigesetzt werden, um eine suffiziente Keiminaktivierung zu gewährleisten [163]. Der Einsatz von Nanosilber in Europa wird kritisch betrachtet, da ein Schutz vor Infektionen nicht sicher ist und sich bei unkontrollierter Anwendung resistente Krankheitserreger entwickeln könnten. Es besteht zudem die Gefahr der Entstehung von Kreuzresistenzen gegenüber Antibiotika [160]. Bakterien, wie *Acinetobacter baumannii*, *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, sowie Hefen haben Eigenschaften, Resistenzen gegen Silber zu entwickeln, jedoch sind die genauen Mechanismen nicht aufgeklärt [158, 163].

Bei Medizinprodukten, die keine ausreichend hohe Freisetzungsrates von Silberionen erreichen, ist eine Resistenzbildung möglich, da nur subletale Silberkonzentrationen erreicht werden [158, 160]. Nanosilber findet eine breite Anwendung in den USA und Asien unter anderem in Textilien, Kosmetik- und Hygieneprodukten, Reinigungsmitteln, Küchenartikeln, medizinischen Produkten, Verpackungen und Produkten für Babys [160]. Antibakterielle Haushaltsreinigungsmittel haben bei gesunden Personen keinen positiven Einfluss auf die Prävention von Infektionen [164, 165]. Das BfR empfiehlt, auf den Einsatz von Silber oder nanoskaligem Silber als Oberflächenbiozide von Kunststoffen für Lebensmittelverpackungen zu verzichten [158], da es bisher wenige Daten zum Risiko für eine mögliche Migration von Silbernanopartikeln in Lebensmittel gibt [166]. In Lebensmittelkontaktmaterialien ist aufgrund toxikologischer Aspekte die Freisetzungsrates auf 50 ppm festgelegt, die unter den zur Inaktivierung der Bakterien nötigen MHK-Werten liegt. Die Keimbelastung wird also nicht ausreichend reduziert und möglicherweise könnten Resistenzen induziert werden [158].

Bezüglich der Resistenzentwicklung besteht aufgrund der lückenhaften Datenlage für eine wissenschaftliche Risikobewertung Forschungsbedarf und das BfR empfiehlt den Einsatz von antimikrobiell wirksamen Substanzen auf das notwendige Maß und nur für den Einsatz im klinischen Bereich zu begrenzen [158].

6.6 Resistenzentwicklung gegen die PIB

Die PIB mit Porphyrinen in Suspension scheint aktuell unabhängig von dem Resistenzmuster der Bakterien zu wirken. Maisch et al. konnten zeigen, dass die Porphyrine XF70 und XF73 sowohl gegen MSSA als auch gegen MRSA effektiv antimikrobiell wirken [94]. Ein MRSA-Stamm konnte nach mehrmaliger Behandlung mit XF keine erkennbare Resistenz entwickeln. Somit wirken diese PS unabhängig von der Zusammensetzung der Zellwand der Bakterien. Nach Maisch et al. kann bei Veränderungen der Bakterienzellwand, wie steigender Zellwanddicke oder veränderten Verbindungen in der Peptidoglykanschicht, keine Abnahme der Effizienz der verwendeten Porphyrinabkömmlinge XF70 und XF73 festgestellt werden. Für eine andauernde Wirksamkeit der PIB ist dies entscheidend, da Gram(+) Bakterien durch Veränderungen der Zellwand resistent gegen Antibiotika werden können, was für VISA-Isolate gezeigt werden konnte. VISA produziert eine dickere Peptidoglykanschicht, wodurch verschiedene Antibiotika, wie Beta-Laktam- und Glykopeptid-Antibiotika, nicht mehr an das Angriffsziel heranreichen können und unwirksam werden [167]. Der Einsatz der PIB hat bisher keine mutagene Wirkung bei Bakterienzellen gezeigt [106], was verhindert, dass Resistenzen gegen die PS induziert werden und sich photoresistente Bakterien selektieren können. Mit der Zeit wird sich zeigen, ob einige Bakterien Resistenzen gegen die antibakterielle PIB entwickeln. Mögliche Resistenzmechanismen könnten gegen die Aufnahme oder das Andocken der PS entwickelt werden. Gram(-) Bakterien kontrollieren die Aufnahme von Molekülen über ihre äußere Membran [168]. Bei *Salmonella enterica serovar typhimurium* [169] konnte ein Mechanismus zur Reduktion der negativen Ladung der LPS-Moleküle an der äußeren Bakterienmembran gezeigt werden, was dem Bakterium gegenüber dem polykationischen PS Polymyxin B eine Resistenz verleiht. Die Resistenz gegen Polymyxin B könnte ebenfalls bei anderen Bakterienstämmen generell bei dem Einsatz von polykationischen PS zu einer verminderten Wirksamkeit führen, da auf diese Weise die Akkumulation des positiv geladenen PS verhindert würde und es nicht zu der notwendigen PS-Konzentration kommen würde, um eine photodynamische Inaktivierung der Bakterien zu induzieren. [95].

Weitere Resistenzen gegen die photodynamische Inaktivierung von Gram(-) und Gram(+) Bakterien könnten durch porindefiziente Mutanten entstehen und PS könnten nicht mehr in die Bakterienzelle zu ihrem Angriffsziel gelangen. Diese Art von Resistenz konnte bei dem *E. coli*-Stamm K12 gegen Beta-Laktam-Antibiotika und bei Isolaten von *S. aureus* für Vancomycin gezeigt werden [95, 170]. Eine weitere

Resistenz konnte bei *E. coli* durch die Behandlung mit niedrig dosiertem Wasserstoffperoxid induziert werden. Dies resultierte in einer Überexpression von 30 Proteinen, wodurch der Keim durch höhere Dosen von Wasserstoffperoxid nicht mehr abgetötet werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass Bakterienzellen redoxsensitive Transkriptionsfaktoren besitzen, um erhöhte Konzentrationen von ROS zu detektieren [171]. Bei *E. coli* konnten zwei dieser Transkriptionsfaktoren, SoxRS und OxyR charakterisiert werden [172]. Diese Fähigkeit, ROS abzufangen, könnte bei der PIB mit selbstdesinfizierenden Oberflächen dazu führen, dass bei zu geringer ROS-Ausbeute und damit zu geringem oxidativen Stress, der zur Inaktivierung aller Bakterien führen würde, die überlebenden Bakterien eine solche Resistenz entwickeln könnten und diese Art der PIB unwirksam wäre. Bei dem Einsatz der PIB auf inerten Oberflächen mit PS, die ausnahmslos Singulett-Sauerstoff generieren und zudem eine hohe Quantenausbeute besitzen, könnte diese Resistenzentwicklung gegen Radikale umgangen werden, da der Angriff an die Bakterien lediglich durch die Energie des Sauerstoffmoleküls mit einer Energie von 0,98 eV stattfindet.

7 Ausblick

Die PIB durch selbstdesinfizierende Oberflächen könnte zukünftig eine Präventivmaßnahme gegen nosokomiale Infektionen durch multiresistente Keime als Ergänzung zur hygienischen Händedesinfektion darstellen [95], indem beispielsweise Oberflächen, Katheter und andere Medizinprodukte mit einer antibakteriellen Schicht überzogen werden, die phototoxisch wirkt.

Für selbstdesinfizierende Oberflächen werden PS benötigt, die eine hohe Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute generieren und nicht mit dem Polymer, in das sie eingearbeitet werden sollen, reagieren. Das Polymer muss gute Diffusionseigenschaften für den Singulett-Sauerstoff bieten und darf ihn nicht quenchen. Im klinischen oder wirtschaftlichen Bereich werden zur Oberflächendesinfektion von den PS eine niedrige Dunkeltoxizität, Kosteneffizienz und die Kompatibilität mit den Anforderungen der Unternehmen verlangt [173]. Verschiedene PS mit lipophilen Eigenschaften und unterschiedliche Polymermaterialien müssten getestet werden. Eine Verbesserung der Methode der Einarbeitung der PS in die Oberfläche könnte durch kovalente Bindungen der PS an das Trägermaterial wie dem CA-Pulver oder durch chemische Modifizierung der PS-Moleküle erzielt werden, sodass sie zur Mizellenbildung angeregt und dadurch ihre aromatischen Ringsysteme geschützt werden. So würde eine Aggregation der PS-Moleküle in der Polymermatrix verhindert werden, es könnten mehr PS-Moleküle gleichzeitig in den Triplett-Zustand angeregt werden und die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute würde sich erhöhen. In Langzeitstudien muss der Einfluss auf die PS und das Polymer durch Langzeitbestrahlung, durch mechanische Belastung und Beanspruchung des Polymers durch Hitze oder Kälte untersucht werden. Nach der Ansicht von Decraene et al. liegen auch bei langen Bestrahlungszeiten von bis zu 16 Stunden keine starken Veränderungen in dem PS-CA-Gebilde vor und die phototoxische Wirkung des PS in der Oberfläche ist nicht beeinträchtigt [117]. Alternativ wäre eine regelmäßige Erneuerung der Oberfläche bzw. der Beschichtung der Oberfläche zum Beispiel durch aufsprühbare Lacke möglich, um eine suffiziente Singulett-Sauerstoff-Produktion zu gewährleisten [117].

Die Inaktivierung der Bakterien durch photodynamische Prozesse auf inerten Oberflächen wäre in Krankenhäusern möglicherweise effektiver, da dort eine geringere Keimlast pro cm^2 [174] vorliegt, als die konzentrierte Menge an *S. aureus* (10^6 KBE/ml), die bei den hier durchgeführten Versuchen verwendet wurde. Zudem sind in Krankenhäusern längere konstante Bestrahlungszeiten und Intensitäten durch ubiquitäres weißes Licht gegeben, was nach Decraene et al. bei dem Einsatz von

TBO und RB in den Oberflächen eine ausreichende Desinfektion gewährleistet [117]. Die applizierten Lichtdosen auf photodynamisch aktiven Oberflächen bewegten sich in diversen Studien zwischen 0,5 und 200 mW/cm² [101]. Somit würde ubiquitär vorhandenes weißes Licht für die Induktion einer PIB ausreichen, denn die Intensität von direktem Sonnenlicht wurde nach der Weltorganisation für Meteorologie mit der Solarkonstante E₀ bei 1367 W/m² festgelegt [175]. Die Lichtintensität in europäischen Krankenhäusern variiert von 200 lux in Gängen, 1000 lux in Schockräumen und 50000/100000 lux in OP-Sälen [176]. Die Intensität von indirektem weißem Licht in Räumen der Industrie 220 - 540 lux ist ebenfalls ausreichend, um eine photodynamische Reaktion zu initiieren und Mikroorganismen zu inaktivieren [101]. In der Forschungsgruppe von Decraene et al. ist eine photodynamische Inaktivierung von Gram(+) Bakterien auf Kunststoffoberflächen mit Neonlicht, das in Krankenhäusern in Großbritannien ubiquitär eingesetzt wird, erfolgreich [118]. Somit könnte eine Reduktion der Keimlast die Ausbreitung und Kontamination in Krankenhäusern zukünftig verhindern [156].

Durch den Einsatz von selbstdesinfizierenden Oberflächen wäre es möglich, die therapeutische Lücke zwischen Resistenzentwicklung der Bakterien und der Neuentwicklung von Antibiotika zu schließen und NI durch die Reduktion der Keimlast vorzubeugen. Durch die Verwendung von selbstdesinfizierenden Oberflächen in Form von CA-Oberflächen mit eingearbeiteten PS konnte bisher keine erfolgreiche Desinfektion von >99,9% Bakterienreduktion erzielt werden, wie sie in der Klinik und in der Wirtschaft gefordert wird. Jedoch ist es möglich, die Hygienelücke, die bei dem Einsatz von Desinfektionsmitteln auf Alkoholbasis entsteht, durch selbstdesinfizierende Oberflächen zu schließen. Die fachgerechte Anwendung von Desinfektionsmitteln reduziert Keime um über 99,999%. Diese Desinfektion hält aber nur an, bis das Desinfektionsmittel verdunstet ist. Danach werden Oberflächen, Haut oder inerte Materialien, unmittelbar wieder mit Bakterien besiedelt und es entsteht eine Hygienelücke. Durch selbstdesinfizierende Oberflächen, wie sie in der vorliegenden Arbeit entwickelt werden sollten, wäre eine dauerhafte Reduktion der Keimlast gewährleistet und die Hygienelücke würde nicht entstehen.

8 Zusammenfassung

Die Entwicklung und Ausbreitung von multiresistenten Erregern (MRE) in Deutschland nimmt in den letzten Jahren besorgniserregende Ausmaße an. Keime wie MRSA, VRE, VRSA oder ESBL produzierende Bakterien bedeuten eine große gesundheitliche Gefahr und eine enorme finanzielle Belastung für die gesamte Gesellschaft. Durch die Ausbreitung der MRE in deutschen Krankenhäusern ist eine konsequente Hygiene unabdingbar und Übertragungswege müssen gezielt unterbrochen werden. Vor allem multimorbide und immunsupprimierte Patienten sind durch Infektionen mit MRE gefährdet. So entstehende nosokomiale Infektionen (NI) können langwierige und kostenintensive Therapien nach sich ziehen und stellen sowohl die Patienten als auch das Klinikpersonal vor eine große Herausforderung. Zur Verhinderung von NI können neue Technologien, wie selbstdesinfizierende photodynamisch aktive Oberflächen, einen Beitrag leisten.

Bei der photodynamischen Inaktivierung von Bakterien (PIB) auf Oberflächen haben entstehende reaktive Sauerstoffspezies wie Singulett-Sauerstoff oder freie Sauerstoffradikale als toxisches Agens direkt Kontakt zu den Bakterien und inaktivieren diese. Es wurden zur Herstellung dieser photodynamisch aktiven Oberflächen verschiedene Photosensibilisatoren aus der Gruppe der Phenothiazine, Porphyrine und Perinaphthenone in das Gemisch CA-Aceton eingearbeitet. Die CA-Oberflächen mit den PS wurden anschließend auf ihre Stabilität in *Aqua dest.* als Lösungsmittel untersucht und die Beschaffenheit der PS in der CA-Oberfläche spektroskopisch gemessen. Erstmals erfolgte der Nachweis der Singulett-Sauerstoff-Generierung durch diese modifizierten PS-CA-Oberflächen. Die CA-Oberflächen hergestellt mit dem lipophilen PS TPP stellten sich als am stabilsten heraus. Die *S. aureus*-Isolate, aufgetragen auf die TPP-CA-Oberflächen, wurden unter verschiedenen Bedingungen bestrahlt, um die effektivste Methode zur Inaktivierung der Bakterien zu etablieren. Bei den Tests mit den bestrahlten TPP-CA-Oberflächen konnte bei einer Konzentration von 250 μM eine Reduktion der Keimzahl um annähernd 99% (2 \log_{10} -Stufen) erzielt werden.

Das Ergebnis ist für den klinischen Einsatz noch nicht ausreichend, jedoch zeigt sich durch selbstdesinfizierende photodynamisch aktive Oberflächen eine vielversprechende Möglichkeit, die Keimzahl auf Oberflächen auf einem niedrigen Niveau zu halten, was die Verbreitungswahrscheinlichkeit der Keime vermindern und neue NI verhindern könnte.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
C	Celsius
CA	Cellulose-Acetat
cm ²	Quadratcentimeter
DCM	Dichlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ESBL	Extended-spectrum Beta-Laktamase
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
et al.	et alteri
FWHM	full width half maximum
Gram(+)	Grampositiv
Gram(-)	Gramnegativ
gr	Gramm
g	Beschleunigung
hPa	Hektopascal
IR	Infrarot
J	Joule
KBE	koloniebildende Einheit
kHz	Kilohertz
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
µl	Mikroliter
MB	Methylenblau
MHK	minimale Hemmkonzentration
Min	Minute
ml	Milliliter

Abkürzungsverzeichnis

mol	Mol, Stoffmenge
MRE	multiresistente Erreger
MRSA	Methicillin resistenter <i>S. aureus</i>
MSSA	Methicillin sensibler <i>S. aureus</i>
MW	Molekulargewicht
mW	Milliwatt
μM	Mikromol
N_2	Stickstoff
NI	nosokomiale Infektionen
nm	Nanometer
NRZ	Nationales Referenzzentrum
ns	Nanosekunde
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	physiologischer Phosphatpuffer
PDT	Photodynamische Therapie
PIB	photodynamische Inaktivierung von Bakterien
PMT	Photomultiplier tube
PN-Cl	Perinaphthenonchlorid
ppm	parts per million
PS	Photosensibilisator
RB	Rose bengal
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
spp.	Spezies
TBO	Toluidinblau O
TMPyP	meso-5, 10, 15, 20–Tetrakis(1-methyl-4-pyridino)-21H, 23H-porphin
TPP	meso-5, 10, 15, 20-Tetraphenylporphyrin
T_1, τ_T	angeregter Triplett-Zustand
VISA	Vancomycin-intermediate <i>S. aureus</i>

Abkürzungsverzeichnis

VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
VRSA	Vancomycin-resistenter <i>S. aureus</i>
UV	Ultraviolett
>	größer als
<	kleiner als
°	Grad
%	Prozent
τ_{Δ}	Singulett-Sauerstoff-Abklingzeit
Φ_{Δ}	Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute
τ_{Δ}	Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer
t_R	Anstiegszeit von Singulett-Sauerstoff
t_D	Abklingzeit von Singulett-Sauerstoff
C	Anpassung des Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignal
x_{Diff}	freie Weglänge
D	Diffusionskonstate
t	zeitaufgelöstes Lumineszenzsignal
$I(t)$	Lumineszenzintensität

Literaturverzeichnis

1. Clewell, D.B. *Antibiotic Resistance in Bacteria: Origins and Emergence*. 2008
29 July 2008; Available from:
[http://www.scitopics.com/Antibiotic Resistance in Bacteria Origins and Eme
rgence.html](http://www.scitopics.com/Antibiotic_Resistance_in_Bacteria_Origins_and_Emergence.html).
2. Hirsch-Kaufmann Monica, S.M., *Biologie für Mediziner und
Naturwissenschaftler*. Vol. 5., überarbeitete Auflage. 2004, Stuttgart: Georg
Thieme Verlag.
3. Kapil, A., *The challenge of antibiotic resistance: need to contemplate*. Indian J
Med Res, 2005. **121**(2): p. 83-91.
4. Walsh, C., *Where will new antibiotics come from?* Nat Rev Microbiol, 2003.
1(1): p. 65-70.
5. Paulsen, I.T., et al., *Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-
resistant Enterococcus faecalis*. Science, 2003. **299**(5615): p. 2071-4.
6. Dai, T., Y.Y. Huang, and M.R. Hamblin, *Photodynamic therapy for localized
infections--state of the art*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2009. **6**(3-4): p.
170-88.
7. Lawley Trevor, W.B.M., Frost Laura S., *Bacterial conjugation in Gram-negative
bacteria*, in *Plasmid Biology*, F.B.E.a.P.G. J., Editor. 2004, ASM Press:
Washington, D.C. p. 203-226.
8. Kumar, A. and H.P. Schweizer, *Bacterial resistance to antibiotics: active efflux
and reduced uptake*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(10): p. 1486-513.
9. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural products as sources of new drugs over
the last 25 years*. J Nat Prod, 2007. **70**(3): p. 461-77.
10. Fischbach, M.A. and C.T. Walsh, *Antibiotics for emerging pathogens*. Science,
2009. **325**(5944): p. 1089-93.
11. Nathan, C., *Antibiotics at the crossroads*. Nature, 2004. **431**(7011): p. 899-902.
12. Boucher, H.W., et al., *Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the
Infectious Diseases Society of America*. Clin Infect Dis, 2009. **48**(1): p. 1-12.
13. Mielke, M., *Antibiotikaresistenz und nosokomiale Infektionen; Europäischer
Antibiotikatag 2011*. RKI, Epidemiologisches Bulletin, 2011. **45**: p. 409-411.
14. Romanova, N.A., et al., *Role of efflux pumps in adaptation and resistance of
Listeria monocytogenes to benzalkonium chloride*. Appl Environ Microbiol,
2006. **72**(5): p. 3498-503.

15. Bell, S.G., *Antibiotic resistance: is the end of an era near?* Neonatal Netw, 2003. **22**(6): p. 47-54.
16. Holmberg, S.D., S.L. Solomon, and P.A. Blake, *Health and economic impacts of antimicrobial resistance*. Rev Infect Dis, 1987. **9**(6): p. 1065-78.
17. Mielke Martin, B.U., Dr. Geffers C, *Basisdaten der stationären Krankenhausversorgung in Deutschland - nosokomiale Infektionen*. RKI, Epidemiologisches Bulletin, 2010. **Nr. 36**: p. S. 359-361.
18. Clark, N.M., J. Patterson, and J.P. Lynch, 3rd, *Antimicrobial resistance among gram-negative organisms in the intensive care unit*. Curr Opin Crit Care, 2003. **9**(5): p. 413-23.
19. Micek, S.T., et al., *Pseudomonas aeruginosa bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(4): p. 1306-11.
20. Dimopoulos George, M.E.F., *Gram-negative Bacilli - Resistance Issues*, in *Bacterial Infections, European Infectious Disease*. 2007, Biomedical Sciences and the Intensive Care Unit, Attikon University Hospital: Athen.
21. Van Aken Hugo , K.R., Michael Zimpfer, Tobias Welte, *Intensivmedizin*. Vol. 2. überarbeitete Auflage. 2007, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
22. Simon A., N.G., S. Engelhart, G. Molitor, M. Exner, U. Bode, G. Fleischhack, *Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) - Übersicht zu Bedeutung, Prävention und Management in der Pädiatrie*. Robert Koch Institut Hyg Med,, 2004. **29** [7/8]: p. 259-275.
23. Barber, M. and M. Rozwadowska-Dowzenko, *Infection by penicillin-resistant staphylococci*. Lancet, 1948. **2**(6530): p. 641-4.
24. Kresken, M. and D. Hafner, *Drug resistance among clinical isolates of frequently encountered bacterial species in central Europe during 1975-1995. Study Group Bacterial Resistance of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy*. Infection, 1999. **27 Suppl 2**: p. S2-8.
25. Kresken Michael, H.D., Schmitz Franz-Josef, Wichelhaus Thomas A. für die Studiengruppe, *PEG-Resistenzstudie 2007: Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum*, in *Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft Empfindlichkeitsprüfungen & Resistenzen der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. aus dem Jahre 2007*, P.-E.-G.f.C.e.V.A.E. Resistenz, Editor. 2007, Antiinfectives Intelligence, Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH: Rheinbach.

26. EARSS, E.C.f.D.P.a.C., *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010*, in *Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. 2011, EARSS.
27. Geffers, C., D. Sohr, and P. Gastmeier, *Mortality attributable to hospital-acquired infections among surgical patients*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2008. **29**(12): p. 1167-70.
28. Aranaz-Andrés JM, A.-R.C., Vitaller-Murillo J, Ruiz-López P, Limón-Ramírez R, Terol-García E; , *Incidence of adverse events related to health care in Spain: results of the Spanish National Study of Adverse Events*. Journal of epidemiology and community health, 2008. **62** (12): p. 1022-9.
29. Referenzzentrum, N., *Modul MRSA-KISS Referenzdaten*, in *NRZ für Surveillance von nosokomialen Infektionen*, K. Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System, Editor. 2012, Nationales Referenzzentrum: Berlin.
30. Trautmann, M., et al., *Implementation of an intensified infection control program to reduce MRSA transmissions in a German tertiary care hospital*. Am J Infect Control, 2007. **35**(10): p. 643-9.
31. Thompson, R.L., I. Cabezudo, and R.P. Wenzel, *Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Ann Intern Med, 1982. **97**(3): p. 309-17.
32. EARSS, E.C.f.D.P.a.C., *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009*. , in *Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. 2010: Stockholm.
33. Hof Herbert, D.R., *Spezielle Bakteriologie: Grampositive Kokken*, in *Duale Reihe, Medizinische Mikrobiologie*, A.u.K. Bob, Editor. 2005, Thieme Verlag: Stuttgart. p. 301-306.
34. Schön-Hölz Katja, M.M., Weiser Tanja, *Ein Verfahren für die MRSA-Schnelldiagnostik in der klinischen Routine*. Aseptica, 2011. **Heft 3, 17. Jahrgang**: p. 5-8.
35. Robert-Koch-Institute, *Robert Koch-Institut: Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA*. RKI-Ratgeber, Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte, 2007.
36. Davis, K.A., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(6): p. 776-82.
37. Kurita, H., K. Kurashina, and T. Honda, *Nosocomial transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus via the surfaces of the dental operatory*. Br Dent J, 2006. **201**(5): p. 297-300; discussion 291.

38. Sehulster LM, et al., *Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations from CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)*. Centers for Disease Control and Prevention, U.S.D.o.H.a.H.S.C.f.D.C.a.P. (CDC), Editor. 2003: Atlanta, GA 30333.
39. Nassauer, A., *Kontrolle der Weiterverbreitung von MRSA - Personal im Gesundheitsdienst als Carrier*. RKI, Epidemiologisches Bulletin, 2008. **Nr. 36**: p. 303-311.
40. Hübner, N.-O., *Maßnahmen zur Händehygiene - Ein Beitrag zum Internationalen Tag der Händehygiene am 5.5*. RKI, Epidemiologisches Bulletin, 2012. **17**: p. 143-145.
41. Hota, B., *Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection?* Clin Infect Dis, 2004. **39**(8): p. 1182-9.
42. Huang, R., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus survival on hospital fomites*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2006. **27**(11): p. 1267-9.
43. Lankford, M.G., et al., *Assessment of materials commonly utilized in health care: implications for bacterial survival and transmission*. Am J Infect Control, 2006. **34**(5): p. 258-63.
44. Lodise, T.P. and P.S. McKinnon, *Clinical and economic impact of methicillin resistance in patients with Staphylococcus aureus bacteremia*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2005. **52**(2): p. 113-22.
45. Cosgrove, S.E., et al., *Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus bacteremia: a meta-analysis*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(1): p. 53-9.
46. Buehlmann, M., et al., *Highly effective regimen for decolonization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carriers*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2008. **29**(6): p. 510-6.
47. Mattner, F., et al., *Long-term persistence of MRSA in re-admitted patients*. Infection, 2010. **38**(5): p. 363-71.
48. Ruef, C., et al., *Decolonisation of patients with wounds colonised by MRSA*. J Hosp Infect, 2009. **72**(1): p. 88-90.
49. Hiramatsu, K., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility*. J Antimicrob Chemother, 1997. **40**(1): p. 135-6.

50. Fridkin, S.K., *Vancomycin-intermediate and -resistant Staphylococcus aureus: what the infectious disease specialist needs to know*. Clin Infect Dis, 2001. **32**(1): p. 108-15.
51. Ploy, M.C., et al., *First clinical isolate of vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus in a French hospital*. Lancet, 1998. **351**(9110): p. 1212.
52. Smith, T.L., et al., *Emergence of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. Glycopeptide-Intermediate Staphylococcus aureus Working Group*. N Engl J Med, 1999. **340**(7): p. 493-501.
53. Sievert, D.M., et al., *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in the United States, 2002-2006*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(5): p. 668-74.
54. Witte, W., *MRSA: Sekundäre Linezolidresistenz bei einem Patienten mit Beatmungspneumonie*. RKI, Epidemiologisches Bulletin, 2008. **Nr. 9**: p. 73-74.
55. Witte, W., *Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2008*. RKI, Epidemiologisches Bulletin, 2009. **Nr. 17**: p. 155-160.
56. Chaberny, I., *Zur Praxis des aktuellen MRSA-Screenings an deutschen Universitätskliniken*. RKI, Epidemiologisches Bulletin, 2005. **42**: p. 389-391.
57. Johnson, P.D., et al., *Efficacy of an alcohol/chlorhexidine hand hygiene program in a hospital with high rates of nosocomial methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection*. Med J Aust, 2005. **183**(10): p. 509-14.
58. Sroka S, R.C., Gastmeier Petra, *Erster internationaler Tag der Händehygiene in Einrichtungen des Gesundheitswesens*. RKI, Epidemiologisches Bulletin, 2009. **Nr. 17**: p. 160-161.
59. Ruden, H. and P. Gastmeier, *[Role and responsibilities of infection control practitioners and hospital epidemiologists in the context of cost effectiveness]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2004. **47**(4): p. 323-8.
60. Geffers, C. and P. Gastmeier, *Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany: epidemiological data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System)*. Dtsch Arztebl Int, 2011. **108**(6): p. 87-93.
61. American-Thoracic-Society, *Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(4): p. 388-416.
62. Carbon, C., *Costs of treating infections caused by methicillin-resistant staphylococci and vancomycin-resistant enterococci*. J Antimicrob Chemother, 1999. **44 Suppl A**: p. 31-6.

63. Chaberny, I.F., et al., *The burden of MRSA in four German university hospitals*. Int J Hyg Environ Health, 2005. **208**(6): p. 447-53.
64. Wernitz, M.H., et al., *Cost analysis of a hospital-wide selective screening programme for methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) carriers in the context of diagnosis related groups (DRG) payment*. Clin Microbiol Infect, 2005. **11**(6): p. 466-71.
65. Engemann, J.J., et al., *Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with Staphylococcus aureus surgical site infection*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(5): p. 592-8.
66. Geldner, G., et al., *[Cost analysis concerning MRSA-infection in ICU]*. Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 1999. **34**(7): p. 409-13.
67. Vonberg, R.P., et al., *[Infection control measures in intensive care units. Results of the German Nosocomial Infection Surveillance System (KISS)]*. Anaesthesist, 2005. **54**(10): p. 975-8, 980-2.
68. Siegel, J.D., et al., *2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings*. Am J Infect Control, 2007. **35**(10 Suppl 2): p. S65-164.
69. Gastmeier, P., et al., *[Surgical site infections in hospitals and outpatient settings. Results of the German nosocomial infection surveillance system (KISS)]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2004. **47**(4): p. 339-44.
70. Reichardt, C., *"Aktion Saubere Hände": Keine Chance den Krankenhausinfektionen!* RKI, Epidemiologisches Bulletin, 2008. **34**: p. 287-290.
71. Pittet, D., et al., *Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. Infection Control Programme*. Lancet, 2000. **356**(9238): p. 1307-12.
72. Boyce, J.M. and D. Pittet, *Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2002. **23**(12 Suppl): p. S3-40.
73. Eckmanns, T., et al., *[Compliance with hand hygiene in intensive care units]*. Dtsch Med Wochenschr, 2001. **126**(25-26): p. 745-9.
74. Wendt, C., *[Compliance with infection control guidelines]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2004. **47**(4): p. 329-33.

75. Eckmanns, T., et al., *Compliance with antiseptic hand rub use in intensive care units: the Hawthorne effect*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2006. **27**(9): p. 931-4.
76. Wendt, C., D. Knautz, and H. von Baum, *Differences in hand hygiene behavior related to the contamination risk of healthcare activities in different groups of healthcare workers*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2004. **25**(3): p. 203-6.
77. Raab, O., *Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien*, in *Zeitschrift für Biologie*. 1900. p. 524-546.
78. Tappeiner Hermann von, J.A., *Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen*, in *Münch. Med. Wochenschau*. 1903. p. 2042-2044.
79. Tappeiner Hermann von, J.A., *Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffen auf Infusorien*. Dtsch Arch Klin Med, 1904. **80**: p. 427-487.
80. Huber, H., *Weitere Versuche mit photodynamischen sensibilisierenden Farbstoffen*. Arch. f. Hyg., 1905. **54**.
81. Moan, J. and Q. Peng, *An outline of the hundred-year history of PDT*. Anticancer Res, 2003. **23**(5A): p. 3591-600.
82. Kato, H., *Photodynamic therapy for lung cancer--a review of 19 years' experience*. J Photochem Photobiol B, 1998. **42**(2): p. 96-9.
83. Prosst, R.L., H.C. Wolfsen, and J. Gahlen, *Photodynamic therapy for esophageal diseases: a clinical update*. Endoscopy, 2003. **35**(12): p. 1059-68.
84. Puolakkainen, P. and T. Schroder, *Photodynamic therapy of gastrointestinal tumors: a review*. Dig Dis, 1992. **10**(1): p. 53-60.
85. Jichlinski, P. and H.J. Leisinger, *Photodynamic therapy in superficial bladder cancer: past, present and future*. Urol Res, 2001. **29**(6): p. 396-405.
86. Nathan, T.R., et al., *Photodynamic therapy for prostate cancer recurrence after radiotherapy: a phase I study*. J Urol, 2002. **168**(4 Pt 1): p. 1427-32.
87. Schweitzer, V.G., *PHOTOFRIN-mediated photodynamic therapy for treatment of early stage oral cavity and laryngeal malignancies*. Lasers Surg Med, 2001. **29**(4): p. 305-13.
88. Baas, P., et al., *Photodynamic therapy with meta-tetrahydroxyphenylchlorin for basal cell carcinoma: a phase I/II study*. Br J Dermatol, 2001. **145**(1): p. 75-8.
89. Pariser, D.M., et al., *Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: results of a prospective randomized multicenter trial*. J Am Acad Dermatol, 2003. **48**(2): p. 227-32.

90. Foote, C.S., *Definition of type I and type II photosensitized oxidation*. Photochem Photobiol, 1991. **54**(5): p. 659.
91. Aveline, B., *Primary processes in photosensitization mechanisms*. Comprehensive Series in Photoscience. 1 ed., 2001. **2**: p. 17-34.
92. Maisch, T., et al., *Combination of 10% EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry in vitro*. J Appl Microbiol, 2009. **107**(5): p. 1569-78.
93. Maisch, T., *Singulett-Sauerstoff: Photodynamische Inaktivierung von Bakterien*. Biospektrum, 2007. **13. Jahrgang**: p. 751-753.
94. Maisch, T., et al., *Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(4): p. 1542-52.
95. Maisch, T., et al., *[Antibacterial photodynamic therapy. A new treatment for superficial bacterial infections?]*. Hautarzt, 2005. **56**(11): p. 1048-55.
96. Kigler Robert, M.M., Rolf-Markus Szeimies, Wolfgang Bäuml, *Bidirectional energy transfer between the triplet T1 state of photofrin and singlet oxygen in deuterium oxide*. Chemical Physics Letters, Elsevier 2001. **343**: p. 543-548.
97. Midden, W.R., Shih Yi Wang, *Singlet Oxygen Generation for Solution Kinetics: Clean and Simple*. Journal of the American Chemical Society, 1983. **105**(13): p. 4129-4135.
98. Baumler, W., et al., *Photo-oxidative killing of human colonic cancer cells using indocyanine green and infrared light*. Br J Cancer, 1999. **80**(3-4): p. 360-3.
99. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy*. Lancet, 1984. **1**(8391): p. 1396-7.
100. Moan, J. and K. Berg, *The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen*. Photochem Photobiol, 1991. **53**(4): p. 549-53.
101. Brovko, L., *Photodynamic treatment: a new efficient alternative for surface sanitation*, in *Advances in Food and Nutrition Research*, S. Taylor, Editor. 2010, Elsevier: Burlington. p. 119-147.
102. Malik, Z., J. Hanania, and Y. Nitzan, *Bactericidal effects of photoactivated porphyrins--an alternative approach to antimicrobial drugs*. J Photochem Photobiol B, 1990. **5**(3-4): p. 281-93.
103. Malik, Z., H. Ladan, and Y. Nitzan, *Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions*. J Photochem Photobiol B, 1992. **14**(3): p. 262-6.

104. Wainwright, M., *Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)*. J Antimicrob Chemother, 1998. **42**(1): p. 13-28.
105. Merchat, M., et al., *Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria*. J Photochem Photobiol B, 1996. **32**(3): p. 153-7.
106. Nitzan, Y. and H. Ashkenazi, *Photoinactivation of Acinetobacter baumannii and Escherichia coli B by a cationic hydrophilic porphyrin at various light wavelengths*. Curr Microbiol, 2001. **42**(6): p. 408-14.
107. Polo, L., et al., *Polylysine-porphycene conjugates as efficient photosensitizers for the inactivation of microbial pathogens*. J Photochem Photobiol B, 2000. **59**(1-3): p. 152-8.
108. Minnock, A., et al., *Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(3): p. 522-7.
109. Minnock, A., et al., *Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both gram-negative and gram-positive bacteria*. J Photochem Photobiol B, 1996. **32**(3): p. 159-64.
110. Merchat, M., et al., *Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins*. J Photochem Photobiol B, 1996. **35**(3): p. 149-57.
111. Nitzan, Y., et al., *Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins*. Photochem Photobiol, 1992. **55**(1): p. 89-96.
112. Hamblin, M.R. and T. Hasan, *Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?* Photochem Photobiol Sci, 2004. **3**(5): p. 436-50.
113. Reddi, E., et al., *Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins*. Photochem Photobiol, 2002. **75**(5): p. 462-70.
114. Vaara, M. and T. Vaara, *Polycations as outer membrane-disorganizing agents*. Antimicrob Agents Chemother, 1983. **24**(1): p. 114-22.
115. Detty, M.R., S.L. Gibson, and S.J. Wagner, *Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy*. J Med Chem, 2004. **47**(16): p. 3897-915.
116. Korczak, D. and C. Schoffmann, *Medical and health economic evaluation of prevention- and control measures related to MRSA infections or -colonisations at hospitals*. GMS Health Technol Assess, 2010. **6**: p. Doc04.

117. Decraene, V., J. Pratten, and M. Wilson, *Cellulose acetate containing toluidine blue and rose bengal is an effective antimicrobial coating when exposed to white light*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(6): p. 4436-9.
118. Decraene, V., J. Pratten, and M. Wilson, *Novel light-activated antimicrobial coatings are effective against surface-deposited Staphylococcus aureus*. Curr Microbiol, 2008. **57**(4): p. 269-73.
119. Maisch, T., et al., *Fast and effective: intense pulse light photodynamic inactivation of bacteria*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2012. **39**(7): p. 1013-21.
120. Eichner, A., et al., *Dirty hands: photodynamic killing of human pathogens like EHEC, MRSA and Candida within seconds*. Photochem Photobiol Sci. **12**(1): p. 135-47.
121. Konopka, K. and T. Goslinski, *Photodynamic therapy in dentistry*. J Dent Res, 2007. **86**(8): p. 694-707.
122. Wainwright, M., et al., *A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1997. **19**(1): p. 75-80.
123. Nonell Santi, G.M.a.T.F.R., *1h-phenalen-1-one-2-sulfonic acid: an extremely efficient singlet oxygen sensitizer for aqueous media*. Afinidad, 1993. **50** (448): p. 445-450.
124. Miles, A.A., S.S. Misra, and J.O. Irwin, *The estimation of the bactericidal power of the blood*. J Hyg (Lond), 1938. **38**(6): p. 732-49.
125. Hedges, A.J., *Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts*. Int J Food Microbiol, 2002. **76**(3): p. 207-14.
126. Baier, J., et al., *Time-resolved investigations of singlet oxygen luminescence in water, in phosphatidylcholine, and in aqueous suspensions of phosphatidylcholine or HT29 cells*. J Phys Chem B, 2005. **109**(7): p. 3041-6.
127. Felgenträger, A., *Spektroskopische Untersuchungen an Photosensibilisatoren zur photodynamischen Inaktivierung von Bakterien*, in *Lehrstuhl für Dermatologie* 2009, Universität Regensburg: Regensburg.
128. Baier, J., et al., *Theoretical and experimental analysis of the luminescence signal of singlet oxygen for different photosensitizers*. J Photochem Photobiol B, 2007. **87**(3): p. 163-73.
129. Bardow, A., B. Nyvad, and B. Nauntofte, *Relationships between medication intake, complaints of dry mouth, salivary flow rate and composition, and the rate of tooth demineralization in situ*. Arch Oral Biol, 2001. **46**(5): p. 413-23.

130. Felgentrager, A., *Study of potential Photosensitizers for self-disinfecting Surfaces using the Method of antimicrobial Photodynamic Action*, in *Klinik und Poliklinik für Dermatologie* 2013, Universität Regensburg.
131. Mathai, E., et al., *Educating healthcare workers to optimal hand hygiene practices: addressing the need*. *Infection*, 2010. **38**(5): p. 349-56.
132. Aboelela, S.W., P.W. Stone, and E.L. Larson, *Effectiveness of bundled behavioural interventions to control healthcare-associated infections: a systematic review of the literature*. *J Hosp Infect*, 2007. **66**(2): p. 101-8.
133. Trick, W.E., et al., *Multicenter intervention program to increase adherence to hand hygiene recommendations and glove use and to reduce the incidence of antimicrobial resistance*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007. **28**(1): p. 42-9.
134. Gould, D.J., et al., *Interventions to improve hand hygiene compliance in patient care*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007(2): p. CD005186.
135. Pittet, D., *Improving adherence to hand hygiene practice: a multidisciplinary approach*. *Emerg Infect Dis*, 2001. **7**(2): p. 234-40.
136. Kollef, M.H., et al., *Silver-coated endotracheal tubes and incidence of ventilator-associated pneumonia: the NASCENT randomized trial*. *JAMA*, 2008. **300**(7): p. 805-13.
137. Malik, Z., et al., *Collapse of K⁺ and ionic balance during photodynamic inactivation of leukemic cells, erythrocytes and Staphylococcus aureus*. *Int J Biochem*, 1993. **25**(10): p. 1399-406.
138. Johansen, Y., et al., *Proton magic angle spinning NMR reveals new features in photodynamically treated bacteria*. *Z Naturforsch C*, 2003. **58**(5-6): p. 401-7.
139. Wakayama, Y., M. Takagi, and K. Yano, *Photosensitized inactivation of E. coli cells in toluidine blue-light system*. *Photochem Photobiol*, 1980. **32**(5): p. 601-5.
140. Wilson, M., *Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases*. *Int Dent J*, 1994. **44**(2): p. 181-9.
141. Ito, T., *Toluidine blue: the mode of photodynamic action in yeast cells*. *Photochem Photobiol*, 1977. **25**(1): p. 47-53.
142. Hiatt, C.W., et al., *Inactivation of viruses by the photodynamic action of toluidine blue*. *J Immunol*, 1960. **84**: p. 480-4.
143. Komerik, N., et al., *In vivo killing of Porphyromonas gingivalis by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**(3): p. 932-40.

144. Finlay, J.C., et al., *Photobleaching kinetics of Photofrin in vivo and in multicell tumour spheroids indicate two simultaneous bleaching mechanisms*. Phys Med Biol, 2004. **49**(21): p. 4837-60.
145. Maisch, T., et al., *The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(17): p. 7223-8.
146. Bozja Jadranka, J.S., Stephen Michielsen, Igor Stojilkovic, *Porphyrin-based, Light-Activated Antimicrobial Materials*. Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry by Wiley Periodicals, Inc., 2003. **41**: p. 2297-2303.
147. Dahl, T.A., W.R. Midden, and P.E. Hartman, *Pure singlet oxygen cytotoxicity for bacteria*. Photochem Photobiol, 1987. **46**(3): p. 345-52.
148. Lipovsky, A., et al., *Sensitivity of Staphylococcus aureus strains to broadband visible light*. Photochem Photobiol, 2009. **85**(1): p. 255-60.
149. Lubart Rachel, H.F., Ronit Lavi, *Photobiostimulation as a function of different wavelengths*. Official Journal of the World Association for Laser Therapy (WALT), 2000. **12**: p. 38-41.
150. Landthaler Michael , H.U., *Entzündliche Dermatosen: 14.8 Akne*, in *Lasertherapie in der Dermatologie: Atlas und Lehrbuch*. 2006, Springer Medizin Verlag Heidelberg: Heidelberg.
151. Cutler, C.W., J.R. Kalmar, and C.A. Genco, *Pathogenic strategies of the oral anaerobe, Porphyromonas gingivalis*. Trends Microbiol, 1995. **3**(2): p. 45-51.
152. Socransky, S.S. and A.D. Haffajee, *Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment*. J Periodontal Res, 1991. **26**(3 Pt 2): p. 195-212.
153. Konig, K., et al., *Red light kills bacteria via photodynamic action*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2000. **46**(7): p. 1297-303.
154. Dougherty, T.J. and W.R. Potter, *Of what value is a highly absorbing photosensitizer in PDT?* J Photochem Photobiol B, 1991. **8**(2): p. 223-5.
155. Wainwright, M., M.N. Byrne, and M.A. Gattrell, *Phenothiazinium-based photobactericidal materials*. J Photochem Photobiol B, 2006. **84**(3): p. 227-30.
156. Decraene, V., J. Pratten, and M. Wilson, *An assessment of the activity of a novel light-activated antimicrobial coating in a clinical environment*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2008. **29**(12): p. 1181-4.
157. Hund-Rinke Kerstin, F.M.-W., Mike Kemper, *Beurteilung der Gesamtumweltexposition von Silberionen aus Biozid-Produkten*. 2008, Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie,

- Fraunhofer-Institut für System- und Innovationsforschung: Dessau-Roßlau. p. 87.
158. BfR, *BfR rät von Nanosilber in Lebensmitteln und Produkten des täglichen Bedarfs ab*, in *Stellungnahme Nr. 024/2010 des BfR vom 28. Dezember 2009*. 2010, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR).
 159. Atiyeh, B.S., et al., *Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature*. Burns, 2007. **33**(2): p. 139-48.
 160. Greßler Sabine, F.R., *Nanosilber in Kosmetika, Hygieneartikeln und Lebensmittelkontaktmaterialien*. Produkte, gesundheitliche und regulatorische Aspekte, ed. H. Ulrich. 2010, Wien: Bundesministerium für Gesundheit, Sektion II.
 161. Luoma, S.N., *Silver nanotechnologies and the environment*, in *old problems or new challenges?* 2008, Woodrow Wilson International Center for Scholars, the Project on Emerging Nanotechnologies.
 162. Singh, N., et al., *NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials*. Biomaterials, 2009. **30**(23-24): p. 3891-914.
 163. Chopra, I., *The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?* J Antimicrob Chemother, 2007. **59**(4): p. 587-90.
 164. Larson, E.L., et al., *Effect of antibacterial home cleaning and handwashing products on infectious disease symptoms: a randomized, double-blind trial*. Ann Intern Med, 2004. **140**(5): p. 321-9.
 165. Tan, L., et al., *Use of antimicrobial agents in consumer products*. Arch Dermatol, 2002. **138**(8): p. 1082-6.
 166. Chaudhry, Q., et al., *Applications and implications of nanotechnologies for the food sector*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2008. **25**(3): p. 241-58.
 167. Boyle-Vavra, S., et al., *A spectrum of changes occurs in peptidoglycan composition of glycopeptide-intermediate clinical Staphylococcus aureus isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(1): p. 280-7.
 168. Ehrenberg, B., Z. Malik, and Y. Nitzan, *Fluorescence spectral changes of hematoporphyrin derivative upon binding to lipid vesicles, Staphylococcus aureus and Escherichia coli cells*. Photochem Photobiol, 1985. **41**(4): p. 429-35.
 169. Vaara, M., et al., *Characterization of the lipopolysaccharide from the polymyxin-resistant pmrA mutants of Salmonella typhimurium*. FEBS Lett, 1981. **129**(1): p. 145-9.

170. Harder, K.J., H. Nikaido, and M. Matsushashi, *Mutants of Escherichia coli that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the ompF porin*. Antimicrob Agents Chemother, 1981. **20**(4): p. 549-52.
171. Cabiscol, E., J. Tamarit, and J. Ros, *Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species*. Int Microbiol, 2000. **3**(1): p. 3-8.
172. Pomposiello, P.J. and B. Dimple, *Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors*. Trends Biotechnol, 2001. **19**(3): p. 109-14.
173. Brovko, L.Y., et al., *Photodynamic treatment: a novel method for sanitation of food handling and food processing surfaces*. J Food Prot, 2009. **72**(5): p. 1020-4.
174. Rutala, W.A., et al., *Environmental study of a methicillin-resistant Staphylococcus aureus epidemic in a burn unit*. J Clin Microbiol, 1983. **18**(3): p. 683-8.
175. Wesselak V., V.S., *Strahlungsquelle Sonne*, in *Photovoltaik: Wie Sonne zu Strom wird*. 2012, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 9-26.
176. CIBSE, C.I.o.B.S.E., *CIBSE lighting guide LG2: hospitals and healthcare buildings*. 1999, CIBSE: London.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Klinikums der Universität Regensburg erstellt. An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, durch deren Hilfe und Unterstützung das Verfassen dieser Arbeit möglich war, insbesondere:

Herrn PD Dr. rer. nat. Tim Maisch danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Durchführung dieser Promotionsarbeit. Zudem bedanke ich mich herzlich für die herausragende und freundliche Betreuung und Unterstützung in allen Belangen bei der Arbeit im Labor und der Promotion. Es war eine wunderbare Erfahrung Teil eines solch harmonischen, effizienten Teams zu sein und ich werde die Zeit niemals vergessen und in bester Erinnerung behalten.

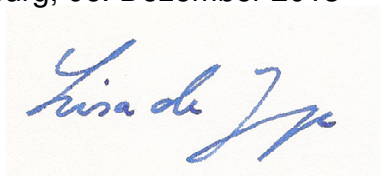
Prof. Dr. Wolfgang Bäumler danke ich für die Möglichkeit die Experimente im Labor durchführen zu können und für die Möglichkeit ein Teil des Forschungsteams zu sein.

Mein herzlicher Dank gilt dem Forschungsteam der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg und der herzlichen Integration in das Team. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. physiol. Ariane Felgenträger für die Kooperation in physikalischen Belangen und die Unterstützung bei der Ausarbeitung dieser Punkte in der Promotion. Bei Herrn Dr. rer. nat. Andreas Späth möchte ich mich für die Bereitstellung neuentwickelter Photosensibilisatoren und bei Herrn Francesco Santarelli für die Unterstützung bei den medialen Aspekten meiner Doktorarbeit bedanken.

Meinen Eltern danke ich von Herzen, dass sie mich während der gesamten Zeit meiner Ausbildung immer sowohl finanziell als auch moralisch unterstützt haben und mir so die freie Entfaltung in meinem Studium ermöglichten.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 06. Dezember 2013

A handwritten signature in blue ink, reading "Lisa de Jpe", is centered on a light beige rectangular background.